

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-526634

(P2001-526634A)

(43) 公表日 平成13年12月18日 (2001. 12. 18)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
A 6 1 K	9/12	A 6 1 K	9/12
	9/14		9/14
	9/72		9/72
	31/135		31/135
	31/352		31/352
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 57 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-534332  
 (86) (22) 出願日 平成9年11月17日 (1997. 11. 17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成11年7月15日 (1999. 7. 15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US 97/20930  
 (87) 国際公開番号 WO 98/31346  
 (87) 国際公開日 平成10年7月23日 (1998. 7. 23)  
 (31) 優先権主張番号 784, 421  
 (32) 優先日 平成9年1月16日 (1997. 1. 16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/059, 004  
 (32) 優先日 平成9年9月15日 (1997. 9. 15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 マサチューセッツ インスティテュート  
 オブ テクノロジー  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
 02139 ケンブリッジ, マサチューセッツ  
 アベニュー 11  
 (71) 出願人 ザ ペン ステート リサーチ ファウン  
 デーション  
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア 16802  
 ユニバーシティ パーク, オールド メ  
 イン 207  
 (74) 代理人 弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

## (54) 【発明の名称】 吸入用粒子の調製

## (57) 【要約】

肺系への薬物送達のための、界面活性剤および/または正もしくは負に荷電した治療薬と反対の電荷の荷電分子との親水性もしくは疎水性複合体を取り込んだ粒子、ならびにその合成方法および投与方法が提供される。好ましい態様において、本粒子は、生分解性材料からなり、 $0.4 \text{ g/cm}^3$ 未満のタップ密度および $5 \mu\text{m} \sim 30 \mu\text{m}$ の質量平均直径を有し、それはともに、約1~3ミクロンの粒子の空気力学的直径を与える。本粒子は、生分解性ポリマー等の生分解性材料から形成されてもよい。例えば、本粒子は、ポリ(乳酸)もしくはポリ(グリコール酸)またはそれらのコポリマーから形成されてもよい。あるいは、本粒子は、治療薬または診断薬と界面活性剤とからのみ形成されてもよい。界面活性剤は、粒子形成後に粒子を被覆することまたは粒子形成前に粒子を形成する材料中に界面活性剤を取り込むこと等により粒子表面に取り込むことができる。界面活性剤の例には、ジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 等のホスホグリセリドが含まれる。本粒子は、様々な治療薬の全身的または局所的送達を可能にする気道への投

与のために、有効にエアロゾル化されうる。正または負に荷電した治療薬と反対の電荷の分子との複合体の形成は、投与後の血流への該薬剤の放出速度の制御を可能ならしめる。

## 【特許請求の範囲】

1. 治療薬および界面活性剤を取り込んだ生体適合性粒子を含有してなる、肺系への薬物送達用微粒子組成物であって、該粒子は、約1～5ミクロンの空気力学的直径の粒子を与えるのに有効な0.4 g/cm<sup>3</sup>未満のタップ密度および5 μm～30 μmの平均直径を有する組成物。
2. 該粒子の空気力学的直径が約1～3ミクロンである請求項1または17記載の組成物。
3. 該粒子の少なくとも50%が、3 μm～5 μmの空気力学的直径および0.2 g/cm<sup>3</sup>未満のタップ密度を有する請求項1または17記載の組成物。
4. 肺への投与に関して製薬上許容されうる担体をさらに含有してなる請求項1または17記載の組成物。
5. 該粒子が生分解性ポリマーを含有してなる請求項1または17記載の組成物。
7. 該粒子が賦形剤を含有してなる請求項1または17記載の組成物。
8. 該粒子が不規則な表面構造を有する請求項1または17記載の組成物。
9. 該界面活性剤を該粒子の表面に被覆した請求項1または17記載の組成物。
10. 該界面活性剤が該粒子内および該粒子の表面上に取り込まれた請求項1または17記載の組成物。
11. 治療薬がタンパク質、多糖、脂質、核酸およびそれらの組合せからなる群より選ばれたものである請求項1または17記載の組成物。
12. 治療薬がヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれたものである請求項1または17記載の組成物。
13. 治療薬がインシュリン、カルシトニン、ロイプロリド、顆粒球コロニー刺激因子、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、ソマトスタチン、テストステロン、プロゲステロン、エストラジオール、ニコチン、フェンタニル、ノルテストロン、クロニジン、スコボロミン、サリチラート、クロモリンナトリウム、サルメテロール、ホルメテロール、バリウムおよびアルブテロールからなる群より選ばれ

たものである請求項11記載の組成物。

14. 該界面活性剤が脂肪酸、リン脂質およびブロックコポリマーからなる群より選ばれたものである請求項1または17記載の組成物。

15. 該界面活性剤がホスホグリセリドである請求項14記載の組成物。

16. 該界面活性剤がL- $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルコリンである請求項14記載の組成物。

17. 治療薬および界面活性剤で形成された粒子を含有してなる、肺系への送達用組成物であって、該界面活性剤は、該粒子の全重量の60%を越える構成要素である組成物。

18. 電荷種である治療薬と、該治療薬の電荷と反対の電荷を有し、該治療薬と複合体を形成する分子とを取り込んだ生体適合性粒子を含有してなる、肺系への薬物送達用微粒子組成物。

19. 該粒子が約1~5ミクロンの空気力学的直径の粒子を与えるのに有効な0.4g/cm<sup>3</sup>未満のタップ密度および5 $\mu$ m~30 $\mu$ mの平均直径を有する、請求項18記載の組成物。

20. 該薬剤が親水性であり、該分子が疎水性部分を含み、該薬剤と該分子とが複合体を形成してなる請求項18記載の組成物。

21. 該治療薬が負に荷電しており、該分子が親油性複合体を形成してなる請求項18記載の組成物。

22. 該治療薬がインシュリン、カルシトニン、ロイプロリド、顆粒球コロニー刺激因子、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、ソマトスタチン、テストステロン、プロゲステロン、エストラジオール、ニコチン、フェンタニル、ノルエステロン、クロニジン、スコポロミン、サリチラート、クロモリンナトリウム、サルメテロール、ホルメテロール、バリウムおよびアルブテロールからなる群より選ばれたものである請求項18記載の組成物。

23. 荷電分子がプロタミンである請求項18記載の組成物。

24. 該治療薬がインシュリンであり、該分子がプロタミンであり、該複合体

がさらに亜鉛を含有してなる請求項 18 記載の組成物。

25. テストステロン、プロゲステロン、エストラジオールおよびノルテストロンからなる群より選ばれた該治療薬を含有してなる、肺系への送達用組成物。

26. 該治療薬がエストラジオールである請求項 25 記載の組成物。

27. インシュリンまたはアルブテロールを含有してなる、肺における徐放性組成物。

28. インシュリン、プロタミンおよび亜鉛の複合体を含有してなる請求項 27 記載の組成物。

29. 少なくとも 24 時間の持続した血清インシュリン濃度を提供する請求項 27 記載の組成物。

30. 請求項 1～29 いずれか記載の組成物の有効量を、治療を要する患者の気道に投与することを含む、肺系への薬物送達方法。

31. 請求項 1～29 いずれか記載の組成物を調製する工程を含む、肺系への送達用医薬の製造方法。



## 【発明の詳細な説明】

吸入用粒子の調製発明の背景

本発明は、概して肺系への薬物送達用粒子に関する。

気道に治療薬を送達するためのエアロゾルは、例えば、アドジェイ (Adjei, A.) およびガレン (Garren, J.) Pharm. Res., 7:565-569 (1990) やザネン (Zanen, P.) およびラム (Lamm, J.-W.J.) Int. J. Pharm., 114:111-115 (1995) などに記述されている。気道は、上気道（口腔咽頭および喉頭を含む）と、それに続く下気道（気管とそれに続く気管支および細気管支への分岐を含む）を包含する。上下気道は誘導気道と呼ばれている。終末細気管支は次いで呼吸細気管支に分かれ、それらが最終的な肺ガス交換部、肺胞または深部肺につながっている。ゴンダ (Gonda, I.) 「Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract (気道への治療薬および診断薬送達用エアロゾル)」 Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313 (1990) 。深部肺または肺胞は全身薬物送達のための吸入用治療エアロゾルの一次標的である。

吸入用エアロゾルは、喘息や嚢胞性線維症を含む局所性肺疾患の治療に使用されており (Andersonら, Am. Rev. Respir. Dis., 140:1317-1324(1989)) 、またペプチドとタンパク質の全身送達にも利用できる可能性がある (PattonおよびPlatz, Advanced Drug Delivery Reviews, 8:179-196(1992)) 。しかし、肺薬物送達法には高分子の送達に関して多くの問題があり、それらの問題にはエアロゾル適用中のタンパク質変性、吸入された薬物の口咽頭腔での過度の損失（しばしば80%を超える）、沈着部位の制御が不十分なこと、呼吸パターンの変動により治療結果が再現性に欠けること、薬物の吸収がしばしば速すぎて局所毒性作用

が起こりうること、および肺マクロファージによる食作用などがある。

吸入療法の効率を向上させるため、治療用エアロゾル吸入装置の設計にはかなりの注意が払われてきた。チムシナ (Timsina) ら, Int. J. Pharm., 101:1-13(1995) とタンジー (Tansey, I.P.), Spray Technol. Market, 4:26-29(1994)。また

乾燥粉末エアロゾル表面組織の設計にも、とりわけ吸入療法の効率をかなり低下させる現象である粒子凝集を避ける必要性に関して、注意が払われてきた。フレンチ(French, D.L.), エドワーズ(Edwards, D.A.)およびニーベン(Niven, R.W.), J. Aerosol Sci., 27:769-783 (1996)。大きい粒子サイズを持つ乾燥粉末製剤(「DPF」)は、凝集性が低下している(Visser, J., Powder Technology 58:1-10(1989))など改善された流動特性を持ち、エアロゾル適用が容易で、食食されにくい可能性がある。ルッツ(RUdt, S.)およびミュラー(R.H. Muller), J. Controlled Release, 22:263-272(1992); タバタ(Tabata, Y.)およびイカダ(Y. Ikada), J. Biomed. Mater. Res., 22:837-858(1988)。一般に、主として5  $\mu$ m未満の範囲の平均直径を持つ吸入療法用乾燥粉末エアロゾルが生産されている。ガンダートン(Ganderton, D.), J. Biopharmaceutical Sciences, 3:101-105(1992); ゴンダ(Gonda, I.)「Physico-Chemical Principles in Aerosol Delivery (エアロゾル送達の物理化学的原理)」[Topics in Pharmaceutical Sciences 1991, Crommelin, D.J. およびK.K.Midha編, Madepharm Scientific Publishers社(シュトゥットガルト), 95~115頁, 1992]。考えうる様々な利点のなかでもとりわけ効率のよいエアロゾル適用の達成を促進する目的で、大きい「担体」粒子(薬物を含まないもの)が治療用エアロゾルと同時送達されている。フレンチ(French, D.L.), エドワーズ(Edwards, D.A.)およびニーベン(Niven, R.W.), J. Aerosol Sci., 27:769-783(1996)。

ヒトの肺は、加水分解的に切断されうる沈着したエアロゾルを、数分ないし数時間で除去または迅速に分解できる。上気道では、繊毛上皮が、粒子を気道から口腔に向かって押し出す「粘膜繊毛エスカレーター」に寄与している。パビア(Pavia, D.)「Lung Mucociliary Clearance (肺粘膜繊毛クリアランス)」[Aerosols and the Lung: Clinical and Experimental Aspects, Clarke, S.W.およびPavia, D. 編, Butterworths社(ロンドン), 1984]。Andersonら, Am. Rev. Respir. Dis., 140:1317-1324(1989)。深部肺では、肺泡マクロファージが沈着後すぐに粒子を貪食する能力を持つ。ワーハイト(Warheit, M.B.)およびハートスキー(Hartsky, M.A.), Microscopy Res. Tech., 26:412-422(1993); ブレイン(Br

ain, J.D.) 「Physiology and Pathophysiology of Pulmonary Macrophages (肺マクロファージの生理学と病態生理学)」 [The Reticuloendothelial System, S.M. ReichardおよびJ. Filkins編, Plenum社 (ニューヨーク), 315~327頁, 1985] ; ドリーズ(Dorries, A.M.)およびバルバーク(Valberg, P.A.), Am. Rev. Resp. Disease 146:831-837(1991);ゲーア(Gehr, P.)ら, Microscopy Res. and Tech., 26:423-436 (1993)。粒子の直径が3  $\mu\text{m}$ を上回るにつれて、マクロファージによる食作用が次第に少なくなる。カワグチ(Kawaguchi, H.)ら, Biomaterials 7:61-66(1986);クレニス(Krenis, L.J.)およびストラウス(Strauss, B.), Proc. Soc. Exp. Med., 107:748-750(1961);ルッツ(Rudt, S.)およびミュラー(Müller, R.H.), J. Contr. Rel., 22:263-272(1992)。しかし、粒子サイズの増大は、口咽頭または鼻腔領域での過剰な沈着により、(標準質量密度の)粒子が気道と腺房に侵入する確率を最小にすることもわかっている。ヘイダー(Heyder, J.)ら, J. Aerosol Sci., 17:811-825 (1986)。

局所および全身吸入療法にはしばしば治療薬の比較的緩慢な制御放出が役立つ。Gonda, I. 「Physico-chemical principles in aerosol delivery (エアロゾル送達の物理化学的原理)」 [Topics in Pharmaceutical Science 1991, D.J.A. CrommelinおよびK.K. Midha編, シュトゥットガルト: Medpharm Scientific Publishers社, 95~117頁 (1992)]。治療用エアロゾルからの緩慢な放出は、投与された薬物の気道または腺房での滞在時間を延長し、薬物が血流中に現れる速度を低下させうる。また投与頻度が減るので、患者の服薬遵守性が増す。

ランガー(Langer, R.), Science, 249:1527-1533(1990);ゴンダ(Gonda, I.) 「Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract (気道への治療薬および診断薬送達用エアロゾル)」 [Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 6:273-313(1990)]。

肺への制御放出薬物送達は、多くの薬物を服用する方法を簡略化しうる。ゴンダ(Gonda, I.), Adv. Drug Del. Rev., 5:1-9(1990);Zeng, X. ら, Int. J. Pharm., 124:149-164 (1995)。肺への薬物送達は、自己投与が簡単であり、肺が薬物吸収に広い粘膜表面を提供し、吸収される薬物の初回通過肝作用がなく、経口

経路と比較して酵素活性とpHによる薬物分解が少ないので、経口、経皮および非経口投与の魅力的な代替法である。吸入により、高分子を含む数多くの分子の比較的高い生物学的利用率を達成できる。ウォール(Wall, D.A.), *Drug. Delivery*, 2:1-20, 1995); パットン(Patton, J.)およびプラッツ(Platz, R.), *Adv. Drug Del. Rev.*, 8:179-196(1992); ビロン(Byron, P.), *Adv. Drug Del. Rev.*, 5:107-132(1990)。このため、治療薬のエアロゾル製剤がいくつか、肺への送達用に使用または試験されている。パットン(Patton, J.S.)ら, *J. Controlled Release*, 28:79-85(1994); ダム(Damms, B.)およびベインズ(Bains, W.), *Nature Biotechnology*(1996); ニーベン(Niven, R.W.)ら, *Pharm. Res.*, 12(9):1343-1349(1995); コバヤシ(Kobayashi, S.)ら, *Pharm. Res.*, 13(1):80-83(1996)。

現在吸入によって投与されている薬物は、主に液体エアロゾル製剤として提供されている。しかし、多くの薬物および賦形剤、とりわけタンパク質、ペプチド(Liu, R. ら, *Biotechnol. Bioeng.*, 37:177-184(1991))と、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)などの生分解性担体は、長期間水性環境にあると不安定である。このことから液体製剤としての貯蔵には問題が生じうる。また液体製剤を使ったエアロゾル適用ではタンパク質の変性が起こりうる。ムーメンターラ(Mumenthaler, M.)ら, *Pharm. Res.*, 11:12-20(1994)。これらの制限や

他の制限を考慮して、乾燥粉末製剤(DPF)が肺送達用のエアロゾル製剤として再び関心を集めつつある。ダム(Damms, B.)およびベインズ(W. Bains), *Nature Biotechnology*(1996); コバヤシ(Kobayashi, S.)ら, *Pharm. Res.*, 13(1):80-83(1996); チムシーナ(Timsina, M.)ら, *Int. J. Pharm.*, 101:1-1:3(1994)。しかし、DPFの短所の一つは、超微粒子粉末の流動性とエアロゾル適用特性が通常不十分であるため、吸入されたエアロゾルの呼吸可能分率(吸入されたエアロゾルのうち口腔と咽頭での沈着を免れる割合)が比較的低くなることである。ゴンダ(Gonda, I.), *Topics in Pharmaceutical Sciences* 1991(D. CrommelinおよびK. Midha編, シュトゥットガルト: Medpharm Scientific Publishers社(1992))の95~117頁。多くのエアロゾルに伴う主たる問題は、疎水相互作用、静電相互作用、毛管相互作用などの粒子-粒子相互作用によって起こる微粒子凝集である。効

果的な乾燥粉末吸入療法には、治療薬の短期放出用であれ長期放出用であれ、また局所送達でも全身送達でも、ごくわずかな凝集性しか示さない粉末と、薬物が効果的に送達されるまで肺本来のクリアランス機構を回避または一時停止する手段が必要である。

治療薬を肺に送達するため、改良された吸入用エアロゾルが必要とされている。薬物を有効な量で気道または肺泡領域に送達できる薬物担体の開発が必要とされている。さらに、生分解性であって気道または肺泡領域内で薬物の制御放出を行う吸入用エアロゾルとして使用される薬物担体の開発も必要とされている。また、エアロゾル適用特性が改善された肺薬物送達用粒子も必要とされている。

したがって、本発明の目的は、治療薬を肺に送達するための改良された担体を提供することである。本発明のさらなる目的は、深部肺に治療薬を送達するための効果的な担体である吸入用エアロゾルを提供することである。本発明のもうひとつの目的は、深部肺での食作用を回避する肺送達用担体を提供することである。本発明のさらなる目的は、生分解と制御された速度での薬物放出が可能な肺送

達用担体を提供することである。本発明のさらなる目的は、改善されたエアロゾル特性と最適化された粒子-粒子相互作用を持つ肺薬物送達用粒子を提供することである。

#### 発明の要約

治療薬または診断薬を肺系に送達するための、界面活性剤および／または正もしくは負に荷電した治療薬とそれとは反対の電荷を持つ荷電分子との親水性または疎水性複合体を組み込んだ粒子、ならびにそれらの合成および投与法を提供する。界面活性剤の具体例には、ジパルミトイルホスファチジルコリン（「DPPC」）などの天然ホスファチジルコリンがある。親水性または疎水性複合体の具体例としてはインシュリン（負に荷電）とプロタミン（正に荷電）が挙げられる。好ましい態様として、本粒子は、生分解性物質でできた $0.4\text{g}/\text{cm}^3$ 未満のタップ密度を持つ空気力学的に軽い粒子である。これら「空気力学的に軽い」粒子は、一般に $5\text{ }\mu\text{m}$ ～ $30\text{ }\mu\text{m}$ の平均直径を持つ。 $0.4\text{g}/\text{cm}^3$ 未満のタップ密度と $5\text{ }\mu\text{m}$ ～ $30\text{ }\mu\text{m}$ の

平均直径は、約1～5ミクロン、好ましくは約1～3ミクロンの空気力学的直径を持つ粒子を与えるように設計されている。これらの粒子は、生分解性ポリマー、タンパク質または他の水溶性もしくは非水溶性材料などの生分解性物質で形成させうる。トレハロースもしくはラクトースなどの水溶性賦形剤または送達対象のタンパク質などのタンパク質でも粒子を形成させうる。一態様として、本粒子は、もうひとつの荷電分子と複合体化した、患者に送達しようとする治療薬または診断薬のみを含む。第二の態様として、本粒子は、薬剤と界面活性剤のみを含む。第三の態様として、本粒子は、持続的放出をもたらす複合体を形成する荷電分子と界面活性剤を含む。

本粒子は、気道または肺領域への治療薬の送達を増進するために使用できる。本粒子は気道に投与するために効率よくエアロゾル適用でき、多種多様な治療薬の全身送達または局所送達を可能にする。また、これらは、治療薬を保持しな

いさらに大きな担体粒子（例えば約50 $\mu\text{m}$ ～100 $\mu\text{m}$ の平均直径を持つもの）と同時に送達してもよい。本粒子を用いて、本粒子と製薬上許容できる患者への投与用担体、好ましくは吸入投与用担体とを含む組成物を形成することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、L- $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルコリン（「DPPC」）を取り込んでまたは取り込まないで、ダブルエマルジョン法で作製したポリ（D,L-乳酸-コ-グリコール酸）（「PLGA」）マイクロスフェアのイン・ビトロ エアロゾル化後に乾燥粉末吸入装置から放出される初期用量の質量分率を比較したグラフである。

図2は、DPPCを取り込んでまたは取り込まないで、ダブルエマルジョン法で作製したPLGAマイクロスフェアのイン・ビトロ エアロゾル化後にカスケードインパクターの異なるステージで沈着するエアロゾル化された用量の質量分率を比較したグラフである。

図3は、DPPCを取り込んでまたは取り込まないで、噴霧乾燥法で作製したPLGAマイクロスフェアのエアロゾル化挙動を示すグラフであり、イン・ビトロ エアロゾル化後に乾燥粉末吸入装置から放出される初期用量の質量分率を表わしてい

る。

図4は、DPPCを取り込んでまたは取り込まないで、噴霧乾燥法で作製したPLAおよびPLGAマイクロスフェアのイン・ビトロ エアロゾル化挙動を比較したグラフであり、カスケードインパクターの各ステージで沈着するエアロゾル化された用量の質量分率（「呼吸可能分率」に相当）を表わしている。

図5は、単位時間（時間）あたりのインシュリン血漿濃度（ng/ml）を比較したグラフである。

図6は、アルブテロールの放出（%）を経時的（時間）に比較したグラフである。

図7は、様々な比率のDPPC、アルブミン、ラクトースおよびアルブテロールを含む組成物について、アルブテロールのイン・ビトロ放出（%）を経時的（時間）に比較したグラフである。

図8は、単位時間（時間）あたりの気道抵抗変化（cmH<sub>2</sub>O/ml/秒）を比較したグラフである。

#### 発明の詳細な説明

肺系への送達用の界面活性剤および／または正もしくは負に荷電した治療薬または診断薬とそれとは反対の電荷を持つ荷電分子との親水性または疎水性複合体を組み込んだ粒子ならびにそれらの合成法および投与法を提供する。本粒子は治療薬または診断薬を含み得るが、その必要があるわけではない。一態様として、本粒子は、患者に送達される治療薬または診断薬のいずれかのみを含む。第二の態様として、本粒子は、治療薬または診断薬と界面活性剤とを含む。

本粒子は0.4g/cm<sup>3</sup>未満のタップ密度と5 μm～30 μmの平均直径を有し、これらは両者があいまって1～5ミクロン、好ましくは1～3ミクロンの空気力学的直径を与える。この空気力学的直径は、直径5ミクロン未満、好ましくは1～3ミクロンの極めて小さい粒子（これらは次いで、食作用を受ける）を使用することによって既に達成されている肺での最大沈着が起こるように計算されたものである。より大きい直径を持つが十分に軽い（それ故「空気力学的に軽い」と特徴づけられる）粒子の選択は、肺への同等な送達をもたらすが、大きいサイズの粒子

は貧食されない。送達性の向上は、滑らかな表面を持つ粒子よりも粗い表面または不規則な表面を持つ粒子を用いることによって達成できる。界面活性剤の存在は、粒子の凝集を最小限に抑える。治療薬とそれとは反対の電荷を持つ分子との複合体の存在は、その薬剤の持続的放出に備えたものである。

本粒子は、エアロゾル適用による治療薬または診断薬の気道への制御された全身または局所送達に使用できる。エアロゾル適用による本粒子の肺への投与は、

比較的大きい直径を持つ治療用エアロゾル（例えば平均直径が $5\mu\text{m}$ を超えるもの）の深部肺送達を可能にする。本粒子は、粒子凝集を減らし、その粉末の流動性を向上させるために、粗面組織を持つように製作できる。本粒子は、改善されたエアロゾル適用特性を持つ。本粒子は、乾燥粉末吸入装置によるエアロゾル適用を増進し、口腔、咽喉および吸入装置内での沈着の低下をもたらす特徴を持つように製作できる。

本粒子を用いて、本粒子と製薬上許容できる患者への投与用担体（好ましくは吸入投与用担体）とを含む組成物を形成することができる。好適な担体には、吸入療法に通例使用されるものが含まれる。当業者は、吸入による粒子の投与に使用される適切な製薬上許容できる担体を容易に決定できる。

#### 粒子材料

本粒子は、もっぱら治療薬または診断薬だけで調製してもよいし、その薬剤と界面活性剤との組み合わせで調製してもよい。本粒子は、生分解性かつ生体適合性であることが好ましく、治療薬または診断薬を送達するために制御された速度で生分解されうるものであってもよい。本粒子は、様々な材料から製造できる。無機材料と有機材料はどちらも使用できる。例えば、セラミックスを使用してもよい。ポリマー材料と脂肪酸などの非ポリマー材料は、空気力学的に軽い粒子の形成に使用できる。他の好適な材料には、ゼラチン、ポリエチレングリコール、トレハロース、デキストランなどがあるが、これらに限るわけではない。粒子材料などの各種要因に基いて、数秒から数ヶ月にわたる分解および放出時間を持つ粒子を設計し製作できる。空気力学的軽さに寄与しうる粒子の様々な特性には、その粒子を形成する組成物と、不規則な表面構造の存在または粒子内の小孔または



空洞の存在などがある。

#### ポリマー粒子

ポリマー粒子は、任意の生体適合性、好ましくは生分解性ポリマー、コポリマーまたはブレンドから形成されうる。好ましいポリマーは、約 $0.4\text{g/cm}^3$ 未満のタッブ密度、 $5\mu\text{m}$ ～ $30\mu\text{m}$ の平均直径および約1～5ミクロン（好ましくは1～3ミクロン）の空気力学的直径を有する空気力学的に軽い粒子を形成できるものである。これらのポリマーは、i) 薬剤が安定化され送達時に活性が保持されるような、送達対象の薬剤とポリマーの間の相互作用、ii) ポリマー分解速度とそれによる薬物放出速度のプロフィール、iii) 化学修飾による表面特性とターゲティング能、およびiv) 粒子多孔度を含む粒子の様々な特徴が最適化されるように製作しうる。

ポリ無水物などの表面浸食ポリマーを用いて、粒子を形成してもよい。例えば、ポリ〔(p-カルボキシフェノキシ)ヘキサン無水物〕(PCPH)などのポリ無水物を使用してもよい。生分解性ポリ無水物は、米国特許第4,857,311号に記述されている。

もうひとつの態様として、ポリ（ヒドロキシ酸）を含むポリエステルに基くものなどのバルク浸食ポリマーを使用できる。例えば、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸(PLA)またはそれらのコポリマーを用いて、本粒子を形成してもよい。また、これらポリエステルは、アミノ酸などの荷電基または官能化可能基をもつてもよい。好ましい態様として、制御放出性を持つ粒子は、DPPCなどの界面活性剤を取り込んだポリ（D,L-乳酸）および／またはポリ（D,L-乳酸-コ-グリコール酸）（「PLGA」）から形成されうる。

他のポリマーには、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、ポリ（エチレンテレフタレート）、ポリビニル化合物、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、アクリル酸とメタクリル酸のポリマー、セルロースその他の多糖類、ペプチドもしくはタンパク質、またはそれらのコポリマーもしくはブレンドがある。ポリマーは、様々な制

御薬物送達用途に適したイン・ビボでの安定性と分解速度を有するものを選択し

てもよく、またはそうなるように修飾してもよい。

一態様として、空気力学的に軽い粒子は、Hrkachら, *Macromolecules*, 28:473 6-4739(1995)とHrkachら「Poly (L-Lactic acid-co-amino acid) Graft Copolymers: A Class of Functional Biodegradable Biomaterials. (ポリ (L-乳酸-コ-アミノ酸) グラフトコポリマー: 機能性生分解性生体材料の一種)」[*Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplications*, ACS Symposium Series No. 627, Raphael M. Ottenbriteら編, アメリカ化学会, 第8章, 93~101頁, 1996] に記述されているように、官能化ポリエステルグラフトコポリマーから形成される。

生分解性ポリマー以外の材料を用いて、本粒子を形成してもよい。好適な材料には、種々の非生分解性ポリマーと種々の賦形剤が含まれる。また、本粒子は治療薬または診断薬と界面活性剤のみから形成させてもよい。一態様として、粒子表面相互作用の低下によりエアロゾル適用効率を向上させ、肺胞マクロファージの食作用による薬剤の損失が少なくなりうるように、本粒子を界面活性剤から形成し、治療薬または診断薬を含んでもよい。

#### 賦形剤

本粒子は、治療薬または診断薬（または他の望ましい送達用分子）の他に、次の賦形剤の1以上を含むことができ、また、それらを含むことが好ましい：ラクトースなどの糖類、アルブミンなどのタンパク質および／または界面活性剤。

#### 複合体形成材料

送達対象の薬剤が負に荷電している場合（例えばインシュリンなど）は、プロタミンまたは他の正に荷電した分子を添加して、その負に荷電した薬剤の持続的放出をもたらす親油性複合体を提供することができる。負に荷電した分子を用いて、不溶性の正に荷電した薬剤にすることができる。

#### 界面活性剤

粒子のエアロゾル適用特性を改善するために粒子に取り込みうる界面活性剤に

は、ホスホグリセリドがある。ホスホグリセリドの具体例には、天然の界面活性物質L- $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルコリン（「DPPC」）などのホスファチジルコリンがある。これら界面活性剤は、例えば、粒子-粒子相互作用を弱めることなどによって表面特性を有利に改善し、粒子表面の付着性を小さくすることができる。肺に内在する界面活性剤の使用により、非生理的界面活性剤を使用する必要を回避しうる。

本明細書において「界面活性剤」という用語は、混和しない二層の界面（水と有機ポリマー溶液の界面、水/空気界面または有機溶媒/空気界面など）に選択的に吸着する任意の物質を指す。一般に界面活性剤は、微粒子に吸着した時に、外部環境に向かって同様に覆われた粒子を引き付けられない部分を提示し、そうすることにより粒子の凝集を減少させる傾向を示すように、親水性部分と親油性部分を持つ。また界面活性剤は、治療薬または診断薬の吸収を促進し、その薬剤の生物学的利用能を向上させうる。

本明細書において「界面活性剤を取り込んだ」粒子とは、その粒子の少なくとも表面に界面活性剤を有する粒子を指す。界面活性剤は、粒子形成中に粒子全体および表面上に取り込まれてもよいし、粒子形成後にその粒子上にコーティングしてもよい。界面活性剤は吸着、イオン結合または共有結合によって粒子表面にコーティングでき、また周囲のマトリックスによって物理的に「閉じ込める」こともできる。例えば、ポリマーマイクロスフェアなどの制御放出性粒子に、界面活性剤を取り込むことができる。

界面活性剤を粒子の表面に与えることにより、静電相互作用、ファンデルワールス力、毛管現象などの相互作用によって粒子が凝集する傾向を低下させうる。粒子表面に界面活性剤が存在すると表面のしわ（粗さ）が増加するので、密接な粒子-粒子相互作用に利用できる表面積が減ることにより、エアロゾル適用性が向上しうる。肺の天然物質である界面活性剤を使用すれば、オプソニン作用が低下して（そのため肺胞マクロファージによる食作用が低下して）、肺内でより長

寿命な制御放出性粒子を提供できる可能性がある。

当技術分野で知られている界面活性剤は、天然界面活性物質を含めて使用でき

る。界面活性剤の他の具体例には、ジホスファチジルグリセロール (DPPG) ; ヘキサデカノール ; ポリエチレングリコール (PEG) などの脂肪族アルコール ; ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル ; パルミチン酸やオレイン酸などの界面活性脂肪酸 ; ソルビタントリオレエート (Span 85) ; グリココール酸塩 ; サーフアクチン ; ポロキシマー (poloxomer) ; ソルビタントリオレエートなどのソルビタン脂肪酸エステル ; チロキサポールおよびリン脂質などがある。

#### 持続的放出を増進する材料

分子が親水性で水性環境で容易に可溶化する傾向がある場合、持続的放出を達成するもうひとつの方法は、コレステロールを使用するか、極めて高い界面活性剤濃度を使用することである。この複合体形成法は、空気力学的に軽くない粒子にも適用される。

#### 粒子の形成

##### ポリマー粒子の形成

ポリマー粒子は、シングルおよびダブルエマルジョン溶媒蒸発法、噴霧乾燥法、溶媒抽出法、溶媒蒸発法、相分離法、単純および複合コアセルベーション、界面重合法、および当業者によく知られている他の方法で製造できる。粒子は、所期の空気力学的直径を持つ粒子が形成されるように条件を最適化するか、1～5ミクロン、好ましくは1～3ミクロンの空気力学的直径を持つ粒子を与える密度と直径を持つ粒子を選択するための追加段階を行うのであれば、当技術分野で知られているマイクロスフェアまたはマイクロカプセル製造法を使って作製できる。

封入された薬剤を送達するためのマイクロスフェアを製造するために開発された方法は、例えば、ドウブロー (Doubrow, M.) 編「Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy」(CRC Press社, ボカラトン, 1992) に記述されているように、文献に記載されている。また、マチオウィッツ (Mathiowitz) およびランガー (Langer), J. Controlled Release 5, 13-22 (1987)、マチオウィッツ (Mathiowitz) ら, Reactive Polymers 6, 275-283 (1987)、マチオウィッツ (Mathiowitz) ら, J. Appl. Polymer Sci. 35, 755-774 (1988) にも方法が記

述されている。例えば、マチオウィッツ(Mathiowitz)ら, Scanning Microscopy 4:329-340 (1990)、マチオウィッツ(Mathiowitz)ら, J. Appl. Polymer Sci. 45, 125-134(1992)、ベニタ(Benita)ら, J. Pharm. Sci. 73, 1721-1724 (1984)に記述されているように、方法の選択はポリマーの選択、サイズ、外面の形態および所望する結晶性に依存する。

例えば、マチオウィッツ(Mathiowitz)ら (1990)、ベニタ(Benita) ; ジャッフエ(Jaffe)に対する米国特許第4,272,398号に記述されている溶媒蒸発法では、ポリマーが塩化メチレンなどの揮発性有機溶媒に溶解される。例えば、0.05g/mlと1.0g/mlの間で、いくつかの異なるポリマー濃度を使用できる。可溶型のまたは微粒子として分散させた治療薬または診断薬をそのポリマー溶液に加え、その混合物をポリ(ビニルアルコール)などの界面活性剤を含む水相に懸濁する。その水相は、例えば蒸留水中1% (w/v) のポリ(ビニルアルコール)濃度などであってもよい。得られたエマルジョンを、有機溶媒の大半が蒸発して固体マイクロスフェアが残るまで攪拌し、そのマイクロスフェアを水で洗浄して凍結乾燥器で終夜乾燥してもよい。異なるサイズ(1~1000ミクロン)と形態を持つマイクロスフェアがこの方法で得られうる。

溶媒除去法は、主としてポリ無水物などの安定性の低いポリマーに用いるように案出された。この方法では、薬剤が選択したポリマーの揮発性有機溶媒(塩化メチレンなど)溶液に分散または溶解される。次に、その混合物をシリコンオイルなどの油に攪拌しながら懸濁してエマルジョンを形成させる。24時間以内に溶媒は油相中に拡散し、エマルジョン小滴が固体ポリマーマイクロスフェアに硬化

する。例えば、マチオウィッツ(Mathiowitz)ら, Reactive Polymers, 6:275(1987)などに記述されているホットメルトマイクロカプセル化法とは異なり、この方法は高い融点と広範囲にわたる分子量を持つポリマーからマイクロスフェアを作製するために使用できる。例えば1~300ミクロンの直径を持つマイクロスフェアがこの方法で得られうる。

一部のポリマー系では、シングルまたはダブルエマルジョン法で調製されたポリマー粒子のサイズが、小滴のサイズに依存して変化する。油中水型エマルシヨ

ン中の小滴が所望のサイズ範囲を持つ粒子の形成に相応しく小さいサイズを持たない場合は、例えば、そのエマルジョンの超音波処理もしくは均質化または界面活性剤の添加などによって、より小さい小滴を調製できる。

上述の方法のいずれかで調製された粒子が所望の範囲外のサイズ範囲を持つ場合は、例えば篩などを使って粒子を分粒し、さらに当業者に知られている技術を使って、密度に従って分離できる。

ポリマー粒子は、噴霧乾燥法によって調製されることが好ましい。サットン(Sutton)とジョンソン(Johnson)がPCT国際公開第86/09814号パンフレットに開示しているような既存の噴霧乾燥法には、粒子の少なくとも90%が1~10 $\mu$ mの平均サイズを持つ水溶性材料の滑らかな球形微粒子の調製が開示されている。本明細書に開示する方法は、水不溶性材料と組み合わされた水溶性材料を含む粗い(滑らかでない)非球形の微粒子を与える。本粒子の少なくとも90%は、5~30 $\mu$ mの平均サイズと、低い質量密度またはタップ密度(0.4g/cc未満)とを有する。

本粒子は、送達対象の治療薬または診断薬とそれとは反対の電荷を持つ分子と様々な複合体を取り込むことができ、また小分子および大分子の持続的放出に備えた脂質などの物質をも含むうる。これらの複合体または物質の添加は、どのようなサイズと形状を持つ粒子にも適用でき、吸入された粒子からの治療薬の放出速度を変化させるのにとりわけ有用である。

#### 空気力学的に軽い粒子

約0.4g/cm<sup>3</sup>未満のタップ密度と1~5ミクロン、好ましくは1~3ミクロンの空気力学的直径を持つ空気力学的に軽い粒子は、本明細書に開示する方法で製作してもよい。

#### 空気力学的に軽い粒子のサイズ

本粒子の質量平均直径は、CoulterマルチサイザーII(Coulter Electronics社、英国ベッドフォードシア、ルートン)を使って測定できる。空気力学的に軽い粒子は、好ましい一態様として、少なくとも約5ミクロンの直径を持つ。試料中の粒子の直径は、粒子組成や合成法などの要因に依存して変動するだろう。試料中の粒子のサイズ分布は、気道内の標的部位での沈着が最適になりうるように選

択できる。

空気力学的に軽い粒子は、例えば濾過や遠心分離などにより、予め設定したサイズ分布を持つ粒子試料を与えるように製作もしくは分離してもよい。例えば、試料中の粒子の30%、50%、70%または80%以上が、少なくとも $5\mu\text{m}$ の設定範囲内の直径を持ちうる。一定のパーセンテージの粒子が含まなければならない設定範囲は、例えば約 $5\sim 30\mu\text{m}$ または任意に $5\sim 15\mu\text{m}$ であってもよい。好ましい態様では、粒子の少なくとも一部が約 $9\sim 11\mu\text{m}$ の直径を持つ。あるいは、少なくとも90%、あるいは95%または99%が設定範囲内の直径を持つように粒子試料を製作することもできる。粒子試料中の空気力学的に軽くて大きな直径（少なくとも約 $5\mu\text{m}$ ）を持つ粒子の存在割合が高いほど、そこに取り込まれた治療薬または診断薬の深部肺への送達が増進される。

一態様として、その粒子試料では、平均直径が例えば約 $7.5\sim 13.5\mu\text{m}$ で、その四分位数間範囲が $2\mu\text{m}$ であってもよい。したがって、例えば粒子の少なくとも30%~40%が設定範囲内の直径を持ちうる。好ましくは、該パーセンテージの粒子が $1\mu\text{m}$ 範囲、例えば $6.0\sim 7.0\mu\text{m}$ 、 $10.0\sim 11.0\mu\text{m}$ または $1.30\sim 14.0\mu\text{m}$

$\mu\text{m}$ 内の直径を持つ。

約 $0.4\text{g}/\text{cm}^3$ 未満のタップ密度と少なくとも約 $5\mu\text{m}$ の平均直径および $1\sim 5$ ミクロン、好ましくは $1\sim 3$ ミクロンの空気力学的直径を持つ空気力学的に軽い粒子（随意に治療薬または診断薬を含んでもよい）は、口腔咽頭領域での慣性および重力沈着を免れやすく、気道または深部肺にターゲティングされる。大きい粒子（少なくとも約 $5\mu\text{m}$ の平均直径）の使用が有利である。というのは、それらは、吸入療法に現在使用されているような小さくて密度の高いエアロゾル粒子よりも効率よくエアロゾル適用できるからである。

また、小さくて比較的密度の高い粒子と比較すると、この大きく（少なくとも約 $5\mu\text{m}$ ）空気力学的に軽い粒子は、食細胞の細胞質ゾル空間から本粒子がサイズ排除されるため、肺胞マクロファージによる食食的取込みと肺からのクリアランスをうまく回避できるだろう。肺胞マクロファージによる粒子の食食は、粒子直径が $3\mu\text{m}$ を超えて増大するにつれて急激に減少する。カワグチ(Kawaguchi, H

.)ら, Biomaterials, 7:61-66(1986);クレニス(Krenis, L.J.)およびストラウス(Strauss, B.), Proc. Soc. Exp. Med., 107:748-750(1961);ルッツ(Rudt, S.)およびミュラー(Muller, R.H.), J. Contr. Rel., 22:263-272(1992)。統計的に等方性の形状を持つ粒子(粗い表面を持つ球体など)の場合、粒子のエンベロープ体積は、完全な粒子崩食のためにマクロファージ内に必要とされる細胞質ゾルの体積にほぼ等しくなる。

したがって、空気力学的に軽い粒子は、肺内で、封入された薬剤の長期にわたる放出を行いうる。吸入に続いて、空気力学的に軽い生分解性粒子は(その比較的低いタップ密度ゆえに)肺内に沈着した後、粒子の大半は肺胞マクロファージによって貪食されることなく緩慢な分解と薬物放出を起しうる。薬物は比較的ゆっくりと肺胞液中に送達され、血流中には制御された速度で送達されうるので、過度に高濃度な薬物に対する被ばく細胞の中毒反応が最小限に抑えられる。このように空気力学的に軽い粒子は、吸入療法、とりわけ制御放出用途に極めて好適である。

吸入療法用の空気力学的に軽い粒子の好ましい平均直径は、少なくとも約5  $\mu$ m、例えば約5~30  $\mu$ mである。本粒子は、気道の選択した領域(例えば深部肺や上気道)への局所的送達にとって適切な素材、表面粗さ、直径およびタップ密度を持つように製作してもよい。例えば、密度が高い粒子または大きい粒子は、上気道送達に使用でき、また同じ治療薬または異なる治療薬を与えられた異なるサイズの粒子を一試料中に含む混合物は、一回の投与で肺の異なる領域を標的にするために投与しうる。

#### 空気力学的に軽い粒子の密度と沈着

本明細書において「空気力学的に軽い粒子」という語句は、約0.4g/cm<sup>3</sup>未満のタップ密度を持つ粒子を指す。乾燥粉末粒子のタップ密度は、GeoPyc™ (Micrometrics Instrument Corp. 社, 30093ジョージア州ノークロス)を使って決定できる。タップ密度は、エンベロープ質量密度の標準的尺度である。等方性粒子のエンベロープ質量密度は、その粒子の質量をその粒子が封入されうる最小球体エンベロープ体積で割ったものと定義される。低いタップ密度に寄与しうる特徴に



は、不規則な表面組織と多孔構造が含まれる。

エアロゾルの慣性インパクションと重力沈降は、正常な呼吸条件では気道と肺の腺房において最も優勢な沈着機構である。エドワーズ(Edwards, D.A.), J. Aerosol Sci., 26:293-317 (1995)。両沈着機構の重要性は、粒子(エンベロープ)体積ではなくエアロゾルの質量に比例して増大する。肺におけるエアロゾル沈着の部位は(約1  $\mu\text{m}$ より大きい平均空気力学的直径を持つ粒子の場合は少なくとも)エアロゾルの質量によって決まるので、粒子表面の不規則性と粒子の多孔性を高めてタップ密度を減少させることにより、他の物理パラメーターがすべて等しい場合は、より大きな粒子エンベロープ体積を肺内に送達することが可能になる。

タップ密度が低い粒子は、実際のエンベロープ球体直径と比較して小さい空気

力学的直径を持つ。空気力学的直径  $d_{\text{aer}}$  は、次式：

$$d_{\text{aer}} = d \sqrt{\rho}$$

[式中、エンベロープ質量  $\rho$  は  $\text{g}/\text{cm}^3$  の単位を持つ] によってエンベロープ球体直径  $d$  に関連づけられる (Gonda, I. 「Physico-chemical principles in aerosol delivery (エアロゾル送達の物理化学的原理)」 [Topics in Pharmaceutical Sciences 1991 (D.J.A. CrommelinおよびK.K. Midha編) 95~117頁, シュトゥットガルト: Medpharm Scientific Publishers社, 1992])。ヒト肺の肺胞領域における単分散エアロゾル粒子の最大沈着(約60%)は、およそ  $d_{\text{aer}} = 3 \mu\text{m}$  の空気力学的直径で起こる。ヘイダー(Heyder, J.)ら, J. Aerosol Sci., 17:811-825 (1986)。その小さいエンベロープ質量密度ゆえに、最大深部肺沈着を示すであろう単分散吸入粉末を構成する空気力学的に軽い粒子の実直径  $d$  は：

$$d = 3/\sqrt{\rho} \mu\text{m} \quad (\text{式中、} \rho < 1\text{g}/\text{cm}^3)$$

[式中、 $d$  は常に  $3 \mu\text{m}$  より大きい] である。例えば  $\rho = 0.1\text{g}/\text{cm}^3$  のエンベロープ質量密度を示す空気力学的に軽い粒子は、 $9.5 \mu\text{m}$  ものエンベロープ直径を持つ粒子で最大沈着を示すだろう。粒子サイズの増大は、粒子間接着力を低下させる。ヴィッサー(Visser, J.), Powder Technology, 58:1-10。したがって、大きい粒子サイズは、食作用による損失の低下に寄与すると共に、低いエンベロープ質

量密度を持つ粒子の深部肺へのエアロゾル適用の効率を向上させる。

#### 粒子のターゲティング

粒子上の反応性官能基を介して粒子にターゲティング分子を結合できる。例えば、ターゲティング分子は、ポリ（乳酸-コ-リジン）（PLAL-Lys）粒子などの官能化ポリエステルグラフトコポリマー粒子のアミノ酸基に結合できる。ターゲティング分子は、粒子の特定レセプター部位（例えば肺内にあるもの）との結合相互作用を可能にする。粒子は、特定の標的に特異的または非特異的に結合するリガンドを取付けることにより、ターゲティングされる。ターゲティング分子の具体例としては、抗体および可変領域を含むその断片、レクチン、ホルモン、

または例えば標的細胞表面上のレセプターに特異的に結合できる他の有機分子が挙げられる。

#### 治療薬

種々の治療薬または予防薬はいずれも本粒子内に取り込むか、またはその薬剤と界面活性剤のみからなる粒子の製造に使用できる。本粒子は、取り込まれた種々の薬剤の動物への局所送達または全身送達に使用できる。例としては、治療活性、予防活性または診断薬活性を持つ合成無機および有機化合物、タンパク質およびペプチド、多糖類および他の糖類、脂質、DNAおよびRNA核酸配列などが挙げられる。核酸配列には遺伝子、相補DNAに結合して転写を阻害するアンチセンス分子、リボザイムが含まれる。取り込まれる薬剤は、例えば血管作用薬、神経作用薬、ホルモン、抗凝固剤、免疫調節剤、細胞傷害剤、予防薬、抗生物質、抗ウイルス薬、アンチセンス、抗原および抗体などといった様々な生理活性を持ちうる。場合により、タンパク質は、通常であれば適当な応答を誘発するためには注射によって投与する必要がある抗体または抗原でありうる。広範な分子量、例えば1モルあたり100～500,000グラム以上を持つ化合物を封入できる。

タンパク質は、100アミノ酸残基以上からなるものと定義され、ペプチドは100アミノ酸残基未満である。特に明記しない限り、タンパク質という用語はタンパク質とペプチドの両方を指す。例としてはインシュリンと他のホルモンが挙げられる。ヘパリンなどの多糖類も投与できる。

ポリマーエアロゾルは、様々な吸入療法の担体として有用である。これらは大小の薬物の封入に使用でき、封入された薬物を数時間ないし数ヶ月の期間にわたって放出し、他の方法では封入された治療薬を損なうかもしれないエアロゾル適用時または肺における沈着後の厳しい条件に耐えうる。

それらの粒子は、例えば喘息、肺気腫または嚢胞性線維症の治療薬など肺への局所送達用治療薬を含んでもよいし、全身治療用の治療薬を含んでもよい。例えば喘息用の $\beta$ -作動薬を投与できるのと同様に、嚢胞性線維症などの疾患を治療

するための遺伝子も投与できる。他の具体的治療薬としては、インシュリン、カルシトニン、ロイプロリド(ゴナドトロピン放出ホルモン(「LHRH」))、顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、ソマトスタチン、テストステロン、プロゲステロン、エストラジオール、ニコチン、フェンタニル、ノルエチステロン、クロニジン、スコポロミン(scopolamine)、サリチレート、クロモリンナトリウム、サルメテロール(salmeterol)、ホルメテロール(formeterol)、アルブテロール、バリウム(Valium)が挙げられるが、これらに限るわけではない。

荷電した治療薬(例えばインシュリンを含むタンパク質の大半)は、その荷電治療薬とそれとは反対の電荷を持つ分子との複合体として投与できる。反対の電荷を持つ分子は、荷電脂質または反対に荷電したタンパク質であることが好ましい。

#### 診断薬

種々の診断薬はいずれも、取り込まれた薬剤を患者への投与後に局所または全身に送達できる粒子内に取り込むことができる。生体適合性の気体または薬学的に許容できる気体はいずれも、当業者に知られている技術を使って本粒子に取り込むか、その粒子の細孔内に閉じ込めることができる。気体という用語は、気体である任意の化合物または撮像を行う温度で気体を形成しうる任意の化合物を指す。一態様として、粒子内での気体の保持は、粒子の周りに気体不透過性障壁を形成させることによって改善される。そのような障壁は当業者には良く知られている。

使用しうる他の撮像剤には、陽電子放射断層撮影(PET)、コンピューター断層撮影(CAT)、単光子放射コンピューター断層撮影、X線、蛍光透視法、磁気共鳴映像法(MRI)に使用される市販の薬剤が含まれる。

MRI用造影剤として好適な物質の例には、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA) およびガドペンテテートジメグルミン(gadopentotate dimeglumine)などの現在利用できるガドリニウムキレート、ならびに鉄、マグネシウム、マンガンの銅、クロムなどがある。

CATとX線に有用な物質の例には、静脈内投与用のヨウ素系物質、例えばジアトリゾエートやヨータラム酸塩を典型とするイオン性モノマー、イオパミドール、イソヘキサール(isohexol) およびヨーベルソール(ioversol)などの非イオン性モノマー、ヨートロール(iotrol) やヨージキサノール(ioxanol)などの非イオン性ダイマー、ヨーキサガルテ(ioxagalte)などのイオン性ダイマーがある。

肺送達法によって送達でき、例えば取り込まれた薬剤の局所もしくは全身送達および／または撮像に使用できる多孔性粒子を製造できる。診断薬を取り込んだ粒子は、当技術分野で利用できる標準的な技術と市販の装置を使って検出できる。

### 投与

本粒子は、単独で、または製薬上許容できる任意の適当な担体（例えば食塩水などの液体か粉末）中で、呼吸器系に投与してもよい。本粒子は、治療薬を含まないさらに大きな（例えば $50\mu\text{m}$ ～ $100\mu\text{m}$ の質量平均直径を有する）担体粒子と同時に送達することができる。

エアロゾルの用量、製剤および送達システムは、例えば、ゴンダ(Gonda, I.) 「Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract (気道への治療薬および診断薬送達用エアロゾル)」 [Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313, 1990] やMoren 「Aerosol dosage forms and formulations (エアロゾルの剤形と製剤)」 [Aerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy, Morenら編, Elsevier (

アムステルダム), 1985] に記述されているように、特定の治療用途に応じ

て選択しうる。

本明細書に開示する粒子によるエアロゾル適用は、界面活性剤または治療薬の荷電複合体を含まない粒子と比較してその効率が高いので、より多くの治療薬を送達できる。生分解性ポリマーの使用により、肺での制御された放出と、長時間にわたる局所作用または全身的生物学的利用能が可能になる。高分子をポリマー外殻内に包含して保護できるので、エアロゾル適用中の高分子薬物の変性を最小限に抑えうる。ペプチドをペプチダーゼ阻害剤と共にカプセル化すれば、ペプチドの酵素分解を最小限に抑えうる。肺送達は、注射の必要性を排除できる点があり利である。例えば、インシュリン注射を毎日行う必要がなくなる。

下記の非限定的実施例を参照すれば本発明の理解が一層深まるだろう。

実施例1：空気力学的に軽いポリ [(p-カルボキシフェノキシ)-ヘキサン無水物] (「PCPH」) 粒子の合成

空気力学的に軽いポリ [(p-カルボキシフェノキシ)-ヘキサン無水物] (「PCPH」) 粒子を次のように合成した。PCPH (分子量約25,000) 100mgを塩化メチレン3.0mLに溶解した。その透明な溶液に塩化メチレンで飽和した1%w/vポリビニルアルコール水溶液 (PVA、分子量約25,000、加水分解率88モル%) 5.0mLを加え、その混合物をボルテックス (Fisher Scientific製Vortex Genie 2) にかけた (最高速度で1分間)。得られた乳白色エマルジョンを、1%PVA 95mLを含むビーカーに注ぎ入れ、0.75インチチップを使って6000RPMで1分間均質化した (Silversonホモジナイザー)。均質化の後、その混合物を磁気攪拌子で攪拌し、イソプロピルアルコール2mLを添加することにより、塩化メチレンをポリマー粒子から素早く抽出した。その混合物を35分間攪拌し続けて微粒子の硬化を完了させた。硬化した粒子を遠心分離によって集め、再蒸留水で数回洗浄した。その粒子を凍結乾燥して、凝集塊のない流動性粉末を得た。収率85~90%。

このプロトコルで製造した典型的パッチの平均直径は6.0 $\mu$ mであるが、わず

かな変更を加えるだけで数百ナノメートルから数ミリメートルにわたる平均直径

を持つ粒子を作りうる。PCPH粒子の典型的バッチの走査型電子顕微鏡写真は、その粒子が不規則な表面形状を持ち高度に多孔性であることを示した。これらの粒子は $0.4\text{g}/\text{cm}^3$ 未満のタップ密度を持つ。

DPPCなどの界面活性剤は、粒子形成前にポリマー溶液に取り込んでもよいし、粒子形成後に粒子表面を界面活性剤でイオンのもしくは共有結合的にコーティングするか、界面活性剤を粒子表面に吸収させてもよい。

#### 実施例2：噴霧乾燥粒子の合成

##### 共通の溶媒に溶けるポリマーと薬物を含む空気力学的に軽い粒子

テストステロンが粒子内に封入されている空気力学的に軽い50:50 PLGA粒子を、次の手順に従って噴霧乾燥法で製造した。50:50のモル比を持つポリ(D,L-乳酸-コ-グリコール酸) [PLGA 50:50, Resomer RG503, B.I. Chemicals社(ニュージャージー州モントベイル)] 2.0gとテストステロン(Sigma Chemical Co.社(ミズーリ州セントルイス)) 0.50gを室温のジクロロメタン100mLに完全に溶解する。次に、Buchi製実験用噴霧乾燥器(モデル190, Buchi社(ドイツ))を用いて、その混合物を0.5mmノズルを通して5mL/分の流量で噴霧乾燥する。圧縮空気の流量は700nlである。吸入口温度は30℃に設定し、排出口温度は25℃に設定する。アスピレーターは減圧度が-20~-25バールになるように設定する。収率は51%で、平均粒子サイズは約 $5\mu\text{m}$ である。吸入口圧縮空気流量を下げたり、他の変数を変化させることによって、より大きな粒子サイズを得ることができる。これらの粒子は、 $0.4\text{g}/\text{cm}^3$ かそれ未満のタップ密度と1~5ミクロンの空気力学的直径から判断して空気学的に軽い。多孔性と表面粗さは、要因の中でも吸入口温度と排出口温度を変化させることによって増大させうる。

##### 異なる溶媒中のポリマーと薬物を含む空気力学的に軽い粒子

モデル親水性薬物(デキストラン)を含む空気力学的に軽いPLA粒子を、次の方法により噴霧乾燥法で製造した。2.0mLの10%w/v FITC-デキストラン(分子量70,000, Sigma Chemical Co.社)水溶液を、プローブ超音波処理(Sonics & Materials製モデルVC-250超音波装置(コネティカット州ダンバリー))でポリ(D,L-乳酸)(PLA, Resomer R206, B.I. Chemicals社)の2%w/vジクロロメタン溶液1

00mL中に乳化した。次にそのエマルジョンを700nL/時の空気流量を使って5mL/分の流量で噴霧乾燥した（吸入口温度=30℃、排出口温度=21℃、減圧度-20ミリバール）。収率は56%である。

#### 空気力学的に軽いタンパク質粒子

空気力学的に軽いリゾチーム粒子を次の方法により噴霧乾燥法で製造した。リゾチーム（Sigma社）4.75gを再蒸留水95mLに溶解し（5%w/v溶液）、0.5mmノズルとBuchi製実験用噴霧乾燥器を使って噴霧乾燥した。圧縮空気の流量は725nL/時だった。リゾチーム溶液の流量は、97~100℃の吸入口設定温度で排気口温度が55~57℃になるように設定した。アスピレーターは減圧度が-30ミリバールになるように設定した。リゾチームの酵素活性は、この工程による影響を受けないことが明らかになり、空気力学的に軽い粒子の収率は66%だった。

#### 空気力学的に軽い高分子量水溶性粒子

空気力学的に軽いデキストラン粒子を次の方法により噴霧乾燥法で製造した。DEAE-デキストラン（Sigma社）6.04gを再蒸留水242mLに溶解し（2.5%w/v溶液）、0.5mmノズルとBuchi製実験用噴霧乾燥器を使って噴霧乾燥した。圧縮空気の流量は750nL/時だった。DEAE-デキストラン溶液の流量は、155℃の吸入口設定温度で排出口温度が80℃になるように設定した。アスピレーターは減圧度が-20ミリバールになるように設定した。この空気力学的に軽い粒子の収率は66%だった。

#### 空気力学的に軽い低分子量水溶性粒子

空気力学的に軽いトレハロース粒子を次の方法により噴霧乾燥法で製造した。トレハロース（Sigma社）4.9gを再蒸留水192mLに溶解し（2.5%w/v溶液）、0.5mmノズルとBuchi製実験用噴霧乾燥器を使って噴霧乾燥した。圧縮空気の流量は650nL/時。トレハロース溶液の流量は100℃の吸入口設定温度で排出口温度が60℃になるように設定した。アスピレーターは減圧度が-30ミリバールになるように設定した。この空気力学的に軽い粒子の収率は36%だった。

#### 空気力学的に軽い低分子量水溶性粒子

ポリエチレングリコール（PEG）は水溶性高分子であるが、水を蒸発させるのに必要な温度より低い室温で融解するので、水溶液からは噴霧乾燥できない。そ

ここで、PEGを低沸点有機溶媒ジクロロメタン溶液から低温で噴霧乾燥した。空気力学的に軽いPEG粒子を次の方法により噴霧乾燥法で製造した。PEG（分子量15,000～20,000、Sigma社）5.0gを再蒸留水100mLに溶解し（5.0%w/v溶液）、0.5mmノズルとBuchi製実験用噴霧乾燥器を使って噴霧乾燥した。圧縮空気の流量750nl/時。PEG溶液の流量は、45℃の吸入口設定温度で排出口温度が34～35℃になるように設定した。アスピレーターは減圧度が-22ミリバールになるように設定した。この空気力学的に軽い粒子（タップ密度0.4g/cm<sup>3</sup>未満）の収率は67%だった。

DPPCなどの界面活性剤は、粒子形成前にポリマー溶液に混合してもよいし、あるいは粒子形成後に界面活性剤で粒子をイオンのまたは共有結合的にコーティングしてもよく、また界面活性剤を粒子に吸収させてもよい。

#### 材料と方法

実施例3と4では次の材料と方法を使用した。

#### 材料

ポリマー：公表値100,000ダルトン（PLGA RG506）および34,000ダルトン（PLGA RG503）の分子量を持つモル比50：50のポリ（D,L-乳酸-コ-グリコール酸）（PLGA）と公表値100,000ダルトンの分子量を持つポリ（D,L-乳酸）（PLA R206）は、Boehringer Ingelheim社（B.I. Chemicals（ニュージャージー州モントベ

イル）が配送）から入手した。19,000の平均分子量を持つ蛍光標識されたFITC-デキストランとL,  $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）は、Sigma Chemical Company社（ミズーリ州セントルイス）から購入した。

#### マイクロスフェアの製造：ダブルエマルジョン

ダブルエマルジョン溶媒蒸発法（Cohen, S. ら, Pharm. Res., 8 (6):713-720 (1991); Tabata, Y. ら, Pharm. Res., 10 (4):487-496 (1993)）に変更を加えて、エアロゾル投与用のマイクロスフェアを製造した。簡単に述べると、300  $\mu$ lのFITC-デキストラン水溶液（50mg/ml）を、マイクロチップを使って出力3の設定（モデルVC-250、Sonics & Materials社（コネティカット州ダンベリー））で超音波処理することにより、ポリマーの塩化メチレン溶液4.0mL（ポリマー200mg）中に氷上で乳化して、内部エマルジョンを形成させた。この第一エマルジョンを



1.0%PVA水溶液100mLに注ぎ入れ、5/8”チップを使って6000RPMで1分間ホモジナイズ（モデルLD4ホモジナイザー、英国Silverston Machines社）して、ダブルエマルジョンを形成させた。そのマイクロスフェアを3時間連続的に攪拌して硬化させ、遠心分離によって集め、再蒸留水で数回洗浄し、凍結乾燥して流動性粉末を得た。DPPCを含有するマイクロスフェアは、最初の乳化に先立ってポリマー溶液にDPPCを3mg/mlの濃度で溶解することによって製造した。

#### マイクロスフェアの製造：噴霧乾燥

フルオレセインイソチオシアネートで標識されたデキストラン（FITC-デキストラン）（モデル親水性薬物）を、新しいエマルジョン／噴霧法でPLAまたはPLGAに封入した。例えば2.0mLの10%w/v FITC-デキストラン（分子量=70,000, Sigma Chemical Co.社）水溶液をPLAの2%w/vジクロロメタン溶液100mL中にプローブ超音波処理によって乳化した。次にそのエマルジョンを、Buchi製ミニスプレードライヤー（モデル190、ドイツBuchi Instruments社）を使って、流量5mL/分、吸入口空気流量700nL/時、吸入口温度30℃、排出口温度21℃および減圧度-20ミリバールで噴霧乾燥した。DPPCを取り込む場合は、これを乳化に先立

って2mg/mLの濃度でポリマー溶液に溶解し、噴霧乾燥した。

#### マイクロスフェアサイズ分布分析

マイクロスフェアサイズ分布は、CoulterマルチサイザーII（Coulter Electronics社、英国ベッドフォードシア、ルートン）を使って決定した。5～10mgのマイクロスフェアに約10滴のCoulter製タイプIA非イオン分散剤を添加した後、2mLのイソトン（isoton）II溶液（Coulter社）2mLを加え、球体を短時間のボルテックス混合によって分散させた。その懸濁液をイソトンII溶液50mLに粒子のコインシデンスが5～8%になるまで加えた。球体の各バッチについて500,000粒子以上をカウントした。

#### 共焦点顕微鏡法による薬物分布

共焦点顕微鏡法のために、FITC-デキストランを薬物として含有するマイクロスフェア数ミリグラムを、短時間のプローブ超音波処理（Vibra-cellモデルVC-250ソニケーター、1/8”マイクロチッププローブ、Sonics & Materials社（コネ

ティカット州ダンベリー) ) により出力4 (50W) の設定で、グリセリンに懸濁した。その懸濁液1滴をガラススライド上に置いてカバーガラスで覆い、マニキュア液で固定した。懸濁液を1時間沈降させてから、共焦点顕微鏡法 (Bio-Rad 製MRC-600コンフォーカル・アキシオプラン顕微鏡) で観察した。

#### 走査型電子顕微鏡法 (SEM) によるマイクロスフェアの形態研究

マイクロスフェアの形態は、15kVに設定したCambridge Instruments社 (マサチューセッツ州ケンブリッジ) 製ステレオスキャン250MK3顕微鏡を使って、走査型電子顕微鏡法 (SEM) で観察した。マイクロスフェアを凍結乾燥し、両面テープの付いた金属スタブにマウントし、観察に先立って金でコーティングした。

#### マイクロスフェア密度分析

マイクロスフェアの高密度は、タップ密度測定によって見積り、Porous Materials社 (ニューヨーク州イサカ) での水銀注入分析によって確認した。

#### 封入されたFITC-デキストラン量とDPPC量の決定

マイクロスフェアに封入されたモデル薬物FITC-デキストランの量は、10.0mgのマイクロスフェアを0.8N NaOH 3.0mLに37℃で終夜溶解し、0.45 $\mu$ mフィルターの (Millipore社) で濾過し、蛍光計を使ってその蛍光を標準曲線と対比して測定 (励起光494nm、放射光525nm) することにより決定した。薬物充填率は、封入されたFITC-デキストランの量を、すべてが封入されとした場合の理論量で割ることにより決定した。マイクロスフェアに封入された界面活性剤DPPCの量は、10.0mgのマイクロスフェアをクロロホルムに溶解し、スチュワート (Stewart) アッセイ (New, R.R.C. 「Characterization of Liposomes (リポソームの特徴づけ)」 [Liposomes: A Practical Approach, R. New編, IRL Press社 (ニューヨーク), 105-161(1990)] ) を使って決定した。

#### イン・ビトロ エアロゾル化と慣性沈着挙動

イン・ビトロ微粒子空気力学特性は、Andersen Mark Iカスケードインパクター (Andersen Samplers社, ジョージア州アトランタ) を使って28.3L/分の空気流量で調べた。粒子の反跳を最小限に抑えるために、金属インパクションプレートにTween 80の薄膜で覆った (Turner, J.およびS. Hering, J. Aerosol Sci.,

18:215-224(1987))。ゼラチンカプセル (Eli Lilly社) に20mgの微粒子を充填し、Spinhaler®吸入装置 (Fisons社, マサチューセッツ州ベッドフォード)

に装填した。エアロゾル化実験は三回ずつ行なった。各実験では、10台の吸入器をインパクター中に30秒間放出させた。エアロゾル化が終了する毎に次のエアロゾル化までの60秒間を観察した。インパクターのステージ0ないし7とフィルター (F) に相当する9ステージのそれぞれに沈着したマイクロスフェア画分を、ポリマーが分解して蛍光物質が完全に溶解するように各プレートをNaOH溶液 (0.8N) で注意深く洗浄することにより、メスフラスコに集めた。37℃で12時間インキュベートした後、それらの溶液を0.45μmフィルターで濾過し、各ステージでの蛍光物質の量を蛍光計を使って494nm (励起光) と525nm (放射光) で測定した。送達された用量の呼吸可能分率は、蛍光測定値に従って、インパクターのス

テージ2からフィルターまでに集められた蛍光量と比較した全蛍光量 (すなわちステージ0からフィルターまでに集められた量) の百分率として計算した。

#### ラットにおけるエアロゾル適用後のイン・ビボ粒子分布

雄スプレーグドーリーラット (150~200g) をケタミン (90mg/kg) とキンラジン (10mg/kg) の混合物で麻酔した。麻酔したラットを、生理的温度を維持するための温度調節パッドを装備した手術台に腹部を上にしておいた。その動物の気管分岐部上に、Harvard社製人工呼吸器 (Rodent Ventilatorモデル683、マサチューセッツ州サウスネーティック) に接続した気管内チューブを挿管した。その動物を300ml/分で20分間強制換気した。DPPCを使ってまたは使わずに作製したマイクロスフェア50mgを気管内チューブに導入した。強制換気期間後に、動物を屠殺し、肺と気管を次に示す気管支肺胞洗浄法で別々に洗浄した：気管カニユーレを挿入し、所定の位置に固定し、Ca<sup>2+</sup> とMg<sup>2+</sup> を含まないフェノールレッド不含ハanks平衡塩溶液 (Gibco社, ニューヨーク州グランドアイランド) (HBSS) 10mlずつで気道を洗浄した。この洗浄操作を合計30mlが集まるまで繰返した。その洗浄液を遠心分離 (400g) し、ペレットを回収してHBSS 2mlに再懸濁した。100μlを血球計で粒子を数えるために取り出した。残りの溶液を10mlの0.4N NaOHと

混合した。37℃で12時間インキュベートした後、各溶液の蛍光を蛍光計で測定した（励起波長494nm、放射波長525nm）。

実施例3：モデル高分子量薬物FITC-デキストランを封入したPLGAマイクロスフェアのダブルエマルジョン法による製作

肺界面活性物質DPPCを使って、また使わずに、ダブルエマルジョン法で作製したマイクロスフェア（MS）の表面形態を示す走査型電子顕微鏡「SEM」写真を得た。SEMによると、DPPCを使って、また使わずに、ダブルエマルジョン法で作製したマイクロスフェアは非常によく似た表面特徴とサイズ分布を持ち、これは下記表1に示すサイズ分布測定で確認された。

マイクロスフェアへのDPPCの捕捉効率（理論値の83%±標準偏差11%、n=6）は、MSの一部をクロロホルムに溶解し、スチュワートアッセイで溶解しているDPPC濃度を検出することにより、表1に示すように確認された。DPPCを使ってダブルエマルジョン法で作製した粒子は凍結乾燥後に水溶液に容易に再懸濁され、光学顕微鏡で調べると乾燥時は塊を含まない。DPPCを使わずにダブルエマルジョン法で作製した粒子は容易に再懸濁したが、光学顕微鏡によればそれらは乾燥時に多少凝集しているように見える。

表1. イン・ビトロおよびイン・ビボエアロゾル化に使用される微粒子の特性<sup>a</sup>

試料	質量平均 (真) 直径 ( $\mu\text{m}$ )	DPPC 装填 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ スフェア)	DPPC 装填効率, (%)	FITC-デキストラン (モデル薬物) 装填効率, (%)
MS DPPC なし	$8.5 \pm 0.76$	0	N/A	95.8
MS DPPC あり	$8.2 \pm 0.18$	$45 \pm 6$	$83 \pm 11$	82.4

a. 値は、±標準偏差で与えられる。

DPPCを使っておよび使わないで作製したマイクロスフェアの全体にわたってモデル薬物FITC-デキストラン（ $M_w$ 9,000）の分布を評価するため、共焦点顕微鏡を使用した。いずれの場合も薬物はポリマーマトリックス全体にわたって均等に分散されており、このことは水性環境に置かれた後の高分子の長期にわたる送達につながりうる。

水銀注入分析法で測定されたマイクロスフェアの密度を表2に示す（この密度はタップ密度測定で確認された）。

表2. 多孔性微粒子とバルク（PLGA 50:50）ポリマーとの比較

試料	密度, $\rho_{MS}$ (g/cc)	吸入可能なサイズ 範囲, $d_{resp}$ ( $\mu m$ )
バルクPLGA	1.35	0.69 - 4.05
MS	$0.37 \pm 0.03$	1.3 - 7.7
DPPCなし		
MS	$0.30 \pm 0.06$	1.46 - 8.58
DPPCあり		

空気力学的直径の概念 (Gonda, I., Topics in Pharmaceutical Sciences 1991 (D. Crommelin and K. Midha編, シュトゥットガルト: Medpharm Scientific Publishers社 (1992)) の95~117頁) を使えば、質量密度  $\rho_{MS}$  が与えられた時に理論的に吸入可能なマイクロスフェアのサイズ範囲を決定できる。具体的には次の方程式2:

$$\frac{0.8}{\sqrt{\rho_{MS}}} \leq d_{resp} \leq \frac{4.7}{\sqrt{\rho_{MS}}} \quad (2)$$

[式中、 $d_{resp}$  は、慣性沈着または重力沈着を起こすことなく気道に侵入し留まることが理論的に可能な粒子の直径 (単位  $\mu m$ ) に相当し (この範囲より小さい粒子は吐き出される)、 $\rho_{MS}$  はg/ccの単位を持つ] に示しうる。表2にはマイクロスフェアの理論的な呼吸可能サイズ範囲も示してある。非多孔性PLGA 50:50マイクロスフェアに関する至適サイズ範囲 (すなわち  $d_{resp}$ ) は0.69~4.05  $\mu m$  である (表2)。DPPCを含まないマイクロスフェアに関する至適呼吸可能サイズ範囲は1.3~7.7  $\mu m$  であり、DPPCを含むマイクロスフェアについては1.46~8.58  $\mu m$  である (表2)。DPPCをPLGAマイクロスフェア製造に使用すると、呼吸可能粒子のサイズに関する上限値が4.05  $\mu m$  から8.5  $\mu m$  以上に増加する。したがって、低密度DPPCマイクロスフェアを使用することにより、より大きな粒子をエアロゾル適用に使用することが可能になり、これは表面積対体積比の低下による粒

子-粒子相互作用の減少や、肺胞マクロファージによる食食に対する感受性の低下など、薬物送達にとって有利な点をもちうる。また、DPPCの主要な効果は、粒子の付着性を低下させるため、後述するようにエアロゾル適用性が改善されることである。

図1と2は、DPPCを使用しておよび使用しないでダブルエマルジョン法で作製したPLGAマイクロスフェアのイン・ビトロ エアロゾル化の結果を示している。

これらのマイクロスフェアは、Spinhaler®乾燥粉末吸入器(DPI)から放出さ

れる乾燥粉末としてエアロゾル化された。図1は、Andersen Mark Iカスケードインパクターを使って測定した、乾燥粉末吸入装置から放出される初期用量の質量分率(DPI効率)を示す。80%近いDPI効率が、DPPCを使っておよび使わずに作製したマイクロスフェアで得られた。これら2バッチに関するDPI効率はほぼ同じであったが、カスケードインパクター内での沈着を観察すると、DPPCを使って作製したマイクロスフェアとDPPCを使わずに作製したマイクロスフェアには大きな相違が認められる(図2)。

図2は、Andersenカスケードインパクターのステージ2からフィルターまで(2～フィルター)に沈着するエアロゾル化された粒子の質量分率(2～フィルター)を示し、これらのステージはマイクロスフェアの呼吸可能画分に相当すると考えられる。ステージ0と1はそれぞれ口腔と咽頭および肺の気道上部にほぼ相当する。ステージ2～フィルターは順に肺のより深い部分に相当する。DPPCをマイクロスフェアの調製に使用すると、インパクターの後ろのステージ(肺の深い部分と考えられる)に到達するマイクロスフェアのパーセンテージが著しく増加することがわかる。表3に示すように、全体として、DPPCを使って作製したエアロゾル化粒子の35%以上( $37.0 \pm 2.1$ )が呼吸可能と考えられるのに対し、DPPCを使わなかった場合は $13.2 \pm 2.9\%$ である。DPPC粒子と非DPPC粒子の呼吸可能分率の大きな相違は、少なくとも部分的には、DPPCの使用による粒子-粒子相互作用の低下によるものである。

マイクロスフェアの理論呼吸可能分率(RF)を見積もり、それを実験的に測定

されたイン・ビトロおよびイン・ビボRFと比較するために、サイズ分布測定結果を分析して、理論呼吸可能サイズ範囲（すなわち  $d_{resp}$ 、表2）内にある各タイプ（DPPCおよび非DPPC）の粒子のパーセンテージ（質量パーセンテージ）を決定した。表3に示すように、呼吸可能なパーセンテージはDPPCを使って作製した粒子の方が非DPPC粒子より高い（それぞれ63%と51%）と予想される。この理論呼吸可能分率は、マイクロスフェアのうち呼吸可能サイズ範囲（方程式（2）で定義される  $d_{resp}$ ）内の直径を持つマイクロスフェアの質量分率に基いているので、これら2バッチのマイクロスフェアの異なるサイズと密度が考慮されている。

表3. イン・ビトロでの微粒子エアロゾル化特性の比較

試料	呼吸可能分率理論値 (即ち、呼吸可能サイズ範囲 でのマイクロスフェアの質量%)	呼吸可能分率測定値 (%, イン・ビトロ)
マイクロスフェア 51 ± 6 DPPCなし		13.2 ± 2.9
マイクロスフェア 63 ± 2 DPPCあり		37.0 ± 2.1

a 理論吸入可能サイズ範囲（ $d_{resp}$ 、表2）およびサイズ分布に基づく。

b Anderson Mark I カスケードインパクターを用いて測定。

Spinhaler装置からの粒子エアロゾル適用中に働く凝集力が、粒子がインパクター系に侵入した後も役割を果たしているかどうか（すなわち主として非DPPC粒

子は吸気流中でも凝集したままで、最初の2つのインパクターステージ（ステージ0および1）での沈着をもたらす）を決定するために、麻酔ラットの気管に接続したHarvard社製人工呼吸システムの吸気流中に重力によって粒子を落下させるイン・ビボ エアロゾル適用実験を行なった。このモデルでは、吸入されたDPPC-PLGA粒子の約63%が気道および遠位肺領域に沈着し、一方、非DPPC粒子は57%が気管を超えて肺に浸透できる。これらの呼吸可能分率は、粒子直径と質量密度に基いて予想される呼吸可能分率にはるかに近い（表3）。

このように、同等のサイズ特性と表面形態特性をもつ粒子であっても、粒子凝集はDPPC含有PLGA粒子の方がDPPCを含まない粒子よりも少ない。このように、DPPCの使用はファンデルワールス引力や静電引力などの粒子間引力を低下させるようである。DPPCの存在が、毛管力による粒子-粒子相互作用を引き起こしうる湿気吸収を減少させる可能性もある。

DPPCの生体適合性とエアロゾル投与用マイクロスフェアの表面特性の改善に加えて、肺の肺泡領域における遅腐食性PLGAマイクロスフェアからのDPPCの放出は、正常な界面活性物質液組成の維持をより効果的に保証し、それにより局所毒性副作用の可能性を最小限に抑えることも考えられる。肺泡界面活性物質液層は平均して厚さ10nmである(Weibel, E.R., Morphometry of the Human Lung, ニューヨーク: Academic Press社(1963))。

実施例4: モデル高分子量薬物FITC-デキストランを封入したPLGAマイクロスフェアの噴霧乾燥法による製作

種々のポリマー担体を使用し、DPPCを取り込んで、またはDPPCを取り込まないで、噴霧乾燥法でマイクロスフェアを作製した。その結果を表4に要約する。

表4. 噴霧乾燥微粒子の特性

試料	質量平均 (真) 直径, ( $\mu\text{m}$ )	DPPC 装填 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ スリ7) および効率 (%)	FITC- デキストラン 装填効率, (%)	ESCAにより DPPCでコート した表面%
R206+DPPC	5.4	a	54.9	a
R206 - DPPC	4.4	-	64.8	-
RG503+DPPC	2.0	62.8	65.2	46.5%
RG503 - DPPC	3.0	-	78.2	-
RG506+DPPC	4.3	89.1	62.7	42-62%
RG506 - DPPC	b	-	100	-

a 決定せず

b 粉末が高凝集したので信頼値が得られず。

表5に示すように、それらマイクロスフェアのエアロゾル適用性も調べた。噴



霧乾燥法によりDPPCを使って作製したマイクロスフェアとDPPCを使わずに作製したマイクロスフェアは、類似するサイズ分布(表5)と質量密度( $0.49 \pm 0.04 \text{g/cc}$ )を持つ。しかし、DPPCを使って作製した噴霧乾燥エアロゾルとDPPCを使わずに作製した噴霧乾燥エアロゾルのエアロゾル適用性能は著しく異なる。図3は、乾燥粉末吸入器からエアロゾル化される低分子量PLGA RG503微粒子の分率(すなわち模擬吸入時にDPIを離れる粒子のパーセンテージで、DPI効率と定義される)がDPPCを使って粒子を作製した場合は70.4%であるのに対して、DPPCを使用しないで作製した粒子では46.8%でしかないことを示している。さらに、Andersenインパクター中にエアロゾル化された後のポリマー微粒子の沈着は、どのタイプのポリマー微粒子でも、DPPC被覆粒子を用いることにより著しく改善される(表5)。DPPCを使用しない場合、インパクターの後ろのステージ(呼吸可能画分に相当(ステージ2～フィルター))に到達するものは、エアロゾル化された粒子

の2%以下である。これに対し、図4に示すように、DPPC被覆マイクロスフェアは最大25.6%がステージ2～フィルターに到達する。塩化メチレンに可溶であってそれゆえ調製時に水を使用する必要がない低分子量薬物を含有する粒子では、さらに高い呼吸可能分率が達成されうる。

表5. DPPC使用または不使用で噴霧乾燥法により調製されたマイクロスフェアのエアロゾル適用データの要約

試料	ステージ1～ フィルターに 到達する170 $\mu\text{m}$ 化 粒子%	ステージ2～ フィルターに 到達する170 $\mu\text{m}$ 化 粒子%	ステージ3～ フィルターに 到達する170 $\mu\text{m}$ 化 粒子%	DPI 効率
R206 + DPPC	$40.4 \pm 8.4$	$25.6 \pm 2.3$	$18.0 \pm 2.7$	$38.6 \pm 3.7$
R206 - DPPC	$7.4 \pm 2.1$	$1.8 \pm 0.5$	$1.1 \pm 0.3$	$41.0 \pm 4.8$
RG503 + DPPC	$36.0 \pm 9.2$	$14.7 \pm 1.53$	$10.4 \pm 0.46$	$70.4 \pm 2.4$
RG503 - DPPC	$3.3 \pm 0.6$	$2.1 \pm 0.3$	$2.0 \pm 0.3$	$46.8 \pm 8.0$
RG506 + DPPC	$13.7 \pm 9.1$	$7.1 \pm 4.1$	$4.1 \pm 2.5$	$76.6 \pm 8.4$
RG506 - DPPC	$1.8 \pm 0.6$	$1.6 \pm 0.6$	$1.4 \pm 0.7$	$74.0 \pm 7.2$

R206 = PLA、分子量約100,000。

RG503 = PLGA50:50、分子量約34,000。

RG506=PLGA50:50、分子量約100,000。

#### 実施例5：エストラジオール含有ラクトース：DPPC粒子の製作

材料と方法：下記の実施例ではいずれもNiro社製アトマイザーポータブルスプレードライヤー（モデル番号68）を使用した。圧力可変の圧縮空気を乾燥器の上方に位置するロータリーアトマイザーに通した。可変的流速を持つ液体供給物は、電子計量ポンプ（LMI社モデル番号A151-192s）で継続的にアトマイザーに送出した。吸入口温度と排出口温度は共に測定可能で、手動で制御できる。容器は、噴霧乾燥された粉末生成物を集めるためのサイクロンにしっかりと取付けた。

比較的高い薬物重量分率を含む大きな多孔性粒子の製造を例証するために、エストラジオール含有粒子を製造した。標準質量密度（0.4g/ccを超える密度）のエストラジオール粒子は、様々な方法で作製できる。この実施例では、粒子が $\beta$ -エストラジオール30重量%、ラクトース62重量%、DPPC 8重量%を含む。ラクトースを脱イオン水に溶解し、エストラジオールとDPPCを95%v/vエタノールに溶解した。これら2つの溶液を混合して85%v/vエタノール溶液を形成させた。溶液中の粉末出発物質の総濃度は、3.25%w/vだった。その溶液を、吸入口温度160℃、排出口温度95℃、噴霧圧2kp/cm<sup>2</sup> (28.45psi)、供給速度34ml/分の条件で噴霧乾燥した。得られた噴霧乾燥粉末は、0.46g/mlのタップ（質量）密度を有した。Microtracパーティクルサイザーを使って測定した、体積に基く平均直径は3.5  $\mu$ mであるから、2.4  $\mu$ mの空気力学的直径を与えた。

もうひとつの例として、エストラジオール70%とDPPC 30%を含有し総粉末濃度が85%v/vエタノール中1.9%w/vである溶液を噴霧乾燥することにより、標準質量密度（約1g/cc）のエストラジオール粒子を調製した。噴霧乾燥器は、吸入口温度150℃、排出口温度85℃、噴霧圧1kp/cm<sup>2</sup> (14.22psi)、供給速度30ml/分の条件で運転した。製造された粒子は、0.62g/mlのタップ密度と6  $\mu$ mの平均直径を持ち、したがって4.7  $\mu$ mの概算空気力学的直径を与えた。

軽い多孔性粒子を製造するために、運転条件と粉末組成の組み合わせを多数、試験した。低密度粒子調製のもうひとつの例は次の通りである。 $\beta$ -エストラジオール90重量%およびDPPC 10重量%の溶液を95%エタノール中に調製した。次に

その溶液を脱イオン水と混合して85%エタノールの溶液を作った。総粉末濃度は、1.1%w/vだった。運転条件は、吸入口温度110℃、排出口温度85℃、噴霧圧1kp/cm<sup>2</sup> (14.22psi)、供給速度30ml/分だった。収率は53.0%だった。得られた粉末は非常に流動性で、SEM（走査型電子顕微鏡）でみたところ、不規則な形状と粗い表面を持つ粒子からなっていた。Microtracで決定した、体積に基く平均

直径は6 μmだった。タップ密度は0.28であったから、2.6ミクロンの概算空気力学的直径を与え、これは1～5ミクロンという所期の範囲内に入っている。

#### 実施例6：ラクトース：DDPC担体粒子の調製

同等の賦形剤濃度を持つ薬物運搬粒子を模倣するために「担体」粒子を作製できる。4つの担体粒子のケーススタディーについて以下に議論した後、その担体粒子に低濃度の薬物を添加する実施例を二つ挙げる。この実施例では粒子中の薬物の低い重量パーセンテージを、総粉末重量の20%未満とみなす。

標準質量密度を持つ担体粒子は、数種類の方法で製造できる。その一例が次の製剤である。ラクトースの脱イオン水溶液とDPPCのエタノール溶液を混合して、85%エタノール中に67重量%ラクトースおよび33重量%DPPCの相対比を持ち、溶液中の総粉末濃度が約0.1%w/vである溶液とした。その溶液を、吸入口温度200℃、排出口温度119℃、噴霧圧3kp/cm<sup>2</sup> (42.72psi)、供給速度40ml/分の条件で噴霧乾燥した。この実験での収率は29.3%だった。得られた噴霧乾燥粉末はタップ（質量）密度が0.41g/ml、SEMから見積もった体積平均直径が2.5 μmであったから、概算空気力学的直径は1.6ミクロンであり、これは1～5ミクロンという所期の範囲内にある。

粉末組成、粉末濃度、溶媒組成および噴霧乾燥器運転条件は、軽い多孔性担体粒子を製造するために変更しうる要因の一部である。ドーナツ様の形態を持つ大きい多孔性粒子を作製できる。そのような粒子は、例えばヒトアルブミン33重量%、ラクトース33重量%およびDPPC 33重量%を含む溶液を調製することによって製造できる。ヒトアルブミンとラクトースを脱イオン水に溶解し、DPPCは95%エタノールに溶解した。これら2つの溶液を混合して85%エタノール溶液とした。総粉末濃度は約0.1%w/vだった。その溶液を、吸入口温度110℃、排出口温度6

0℃、噴霧圧3kp/cm<sup>2</sup> (42.72psi)、供給速度40ml/分の条件で噴霧乾燥した。この実験での収率は38.5%だった。得られた粒子のタップ（質量）密度は0.16g/mlで、Coulterカウンターでのこの粒子のサイズは7.6μmであるから、概算空気力学的直径は3.0μmである。（註：SEMから概算した体積平均サイズとCoulterカウンターによって決定した体積平均サイズは等価とみなしうる。）

#### 実施例7：アルブミン：ラクトース：DPPC粒子の調製

もうひとつのタイプの大きい多孔性粒子は、干しブドウのように見える。このタイプの形態を持つ粒子は、例えばヒトアルブミン20重量%、ラクトース20重量%およびDPPC 60重量%を含む溶液を噴霧乾燥することによって調製できる。ヒトアルブミンとラクトースを脱イオン水に溶解し、DPPCを95%エタノールに溶解した。これら2つの溶液を混合して85%エタノール溶液を形成させた。総粉末濃度は約0.1%w/vだった。その溶液を吸入口温度110℃、排出口温度60℃、噴霧圧3kp/cm<sup>2</sup> (42.72psi)、供給速度40ml/分の条件で噴霧乾燥した。収率は45.0%だった。この粒子のタップ（質量）密度は0.05g/mlであり、SEMによるこの粒子の概算体積平均サイズは7μmであったから、概算空気力学的直径は1.6μmになる。この粒子のエアロゾル化試験は次の結果を与えた：エアロゾル化される割合は58.5%、呼吸可能分率は26.6%、吸入されたエアロゾルの呼吸可能分率は43.8%であった。

#### 実施例8：アルブミン：ラクトース：DPPC粒子の調製

粒子のサイズを増大させるには様々な方法を使用できる。この実施例で調製した粒子は実施例7の粒子とほぼ同じ形態を持つが、その粒子サイズは実施例7の粒子より大きかった。この粒子は次のように調製した。ヒトアルブミン20重量%、ラクトース20重量%およびDPPC 60重量%の溶液を噴霧乾燥した。ヒトアルブミンとラクトースは脱イオン水に溶解し、DPPCは95%エタノールに溶解した。これら2つの溶液を混合して85%エタノール溶液を形成させた。総粉末濃度は約0.2%w/vだった。その溶液を、吸入口温度110℃、排出口温度51℃、噴霧圧2kp/cm<sup>2</sup> (28.48psi)、供給速度66ml/分の条件で噴霧乾燥した。この実験での収率は48

.6%だった。得られた粒子のタップ（質量）密度は0.04g/mlで、SEMによる粒子の概算体積平均サイズは10 $\mu\text{m}$ であったので、概算空気力学的直径は2.0ミクロンになる。

#### 実施例9：インシュリン：アルブミン：ラクトース：DPPC粒子の噴霧乾燥

この実施例では、添加する薬物が20重量%未満であれば、粒子の形態、サイズ、タップ密度およびエアロゾル適用特性にはほとんど変化がないことを示す。例えばヒトインシュリンを実施例7の粒子の約2重量%の濃度で加えた。この粒子はヒトインシュリン2重量%、ヒトアルブミン19重量%、ラクトース19重量%およびDPPC 60重量%の溶液を噴霧乾燥することによって調製した。ヒトインシュリン、ヒトアルブミンおよびラクトースは脱イオン水に溶解し、DPPCは95%エタノールに溶解した。脱イオン水へのヒトインシュリンの溶解度は、数滴のNaOH（5g NaOH/100ml脱イオン水）をインシュリンが溶解状態になるまで添加することによって増大させた。これら2つの溶液を混合して85%エタノール溶液を形成させた。総粉末濃度は約0.1%w/vだった。その溶液を、吸入口温度110℃、排出口温度61℃、噴霧圧3kp/cm<sup>2</sup> (42.74psi)および供給速度40ml/分の条件で噴霧乾燥した。この実験での収率は51.1%だった。得られた粒子のタップ（質量）密度は0.05g/mlで、SEMによるこの粒子の概算体積平均サイズは6.5 $\mu\text{m}$ だったから、概算空気力学的直径は1.5 $\mu\text{m}$ になる。粒子の形態は、実施例7の粒子と非常に似ていた。これら粒子のエアロゾル化試験では次の結果が得られた：エアロゾル化される割合45.0%、呼吸可能分率15.0%、吸入されたエアロゾルの呼吸可能分率58.3%であった。

#### 実施例10：アルブテロール粒子の調製

重量にして比較的少量の薬物を含むアルブテロール粒子も調製した。この実施例では、粒子の4重量%のアルブテロールを添加した点以外は、実施例6に記載の方法に従って粒子を調製した。粒子はアルブテロール4重量%、ヒトアルブミン33重量%、ラクトース33重量%、DPPC 33重量%を含む溶液を噴霧乾燥することによって形成させた。アルブテロール、ヒトアルブミンおよびラクトースを脱イオン水に溶解し、DPPCを95%エタノールに溶解した。それらの溶液を混合して

85%エタノール溶液を形成させた。総粉末濃度は約0.1%w/vだった。その溶液を、吸入口温度110℃、排出口温度60℃、噴霧圧3kp/cm<sup>2</sup> (42.72psi)、供給速度40ml/分の条件で噴霧乾燥した。この実験では収率は46.8%だった。得られた粒子のタップ（質量）密度は0.15g/mlで、Coulterカウンターで測定した粒子のサイズは7.2μmだったので、概算空気力学的直径は2.8μmになる。

#### 実施例11：徐放性インシュリン粒子の調製

インシュリンを不溶性にすることにより、粒子からのインシュリンの持続的放出を達成した。インシュリンを超純水に溶解した(0.02%w/v)。次にプロタミンを（インシュリン／プロタミン＝5/1w/wの比で）加えてインシュリン／プロタミン複合体を形成させた。インシュリン／プロタミン複合体の形成はインシュリンを沈殿させる。溶液を噴霧乾燥できるように、pHをHClで約5に上げることにより、その複合体を溶解した。次に、ラクトースをその溶液に加えた。次に、その水溶液を、DPPCを含む95%v/vエタノール溶液と混合した。その85%v/v溶液中の各賦形剤の最終濃度は、インシュリン／プロタミン／ラクトース/DPPC＝2/0.4/37.6/60%w/vだった。その溶液を吸入口温度110℃、排出口温度60℃、噴霧圧3kp/cm<sup>2</sup> (42.72psi) および供給速度40ml/分の条件で噴霧乾燥した。粒子がイン・ビトロで徐放性を示す能力を評価した。pH7.4のリン酸緩衝食塩水に懸濁した粒子が5時間後に放出した量は、取り込まれたインシュリンの10%未満だった。

#### 実施例12：インシュリン：プロタミン：亜鉛複合体の調製

インシュリン／プロタミン／亜鉛の複合体を含有する粒子を、実施例11に記載の方法に従って調製した。エタノール／水（85：15%v/v）溶液中の各賦形剤の濃度は、インシュリン／プロタミン／塩化亜鉛／ラクトース/DPPC＝2：0.6：0.25：32.4：60（%w/v）だった。その溶液を実施例11と同じ条件で噴霧乾燥した。この製剤もイン・ビトロでインシュリンを持続的に放出することがわかった。

この粒子(8mg)を、エドワーズ(Edwards)ら(Science, 276, 1868(1997))に記載の方法でラットの肺に吸入させた。比較のために、粒子を皮下にも注射し、また同じインシュリン含量を持つ非徐放性インシュリン粒子（プロタミンまたは亜鉛を含まないもの）を皮下注射および吸入投与した。図5は、種々の投与法で投与

されたインシュリンについて、単位時間あたりの血漿濃度を示している。プロタミンまたは亜鉛を含まない粒子が約5時間未満でインシュリンを放出したのに対し、吸入されたプロタミン／亜鉛粒子は少なくとも24時間にわたる持続性の高血漿インシュリン濃度をもたらした。

インシュリン以外の治療薬も同じ方法で複合体化し、粒子に含めることができる。インシュリン (pI=5.3) のように、7.4の生理的pHより低い等電点 (pI) を持つタンパク質は、プロタミンを用いて同じ方法で沈殿させる (例えば成長ホルモン、pI=4.9)。pH7.4より高いpIを持つタンパク質 (例えばLHRH、カルシトニン) は負に荷電した化合物 (例えばデキストラン硫酸) を使うか、適当な塩を添加することによって沈殿させる。この方法は治療用タンパク質以外の薬物 (例えばヘパリン) にも同様に拡張できる。

#### 実施例13：徐放性アルブテロール粒子の調製

粒子からの親水性分子の持続的放出を評価するために、アルブテロール粒子を調製した。このアルブテロール含有粒子は、ラクトースとアルブミンのパーセン

テージを (比率は同じに保ったまま) 減らし、 (様々なパーセンテージ (6、8、10、25%) の) コレステロールとアルブテロール (4%) を添加して、実施例7に記述したように調製した。図6に示すように、コレステロールを添加するほどアルブテロールの緩慢な放出が起った。アルブテロール濃度はUV分光光度計を使って測定した。図6に示すデータは、コレステロールを粒子に取り込むことにより、アルブテロールを持続的に放出させることを証明している。同様の結果は、DPPC濃度を60%以上に増やすことによっても達成できる。

#### 実施例14：アルブミン：DPPC：ラクトース：アルブテロール粒子の放出特性

アルブテロールなどの親水性分子の持続的放出をコレステロールなしでも達成できることを証明するために、DPPC 60%、アルブミン18%、ラクトース18%およびアルブテロール4%を使って、実施例7に記述したように粒子 (平均直径10  $\mu\text{m}$ 、タップ密度0.06 $\text{gram}^3$ ) を調製した。この製剤と、ラクトース (96%) とアルブテロール (4%) だけを含む非徐放性製剤の両方について、アルブテロールのイン・ビトロ放出を図7に示す。コレステロールを含まなくても、アルブテロ

ールの放出はほぼ24時間持続した。

この徐放性アルブテロール粒子が持続的な気管支拡張をもたらしうることを証明するために、実施例12の方法を使って粒子（5mg、すなわちアルブテロール用量200 $\mu$ g）をモルモットに投与した。動物には気道抵抗の測定に先立ってカルバコールを投与した。気道抵抗は、Buxco社のシステムを使ってモニターした。気道抵抗は大きい多孔性粒子の吸入後に急激に低下し（図7および8）、約1日にわたって統計的に低レベルを維持した（ $n=y$ ）。

実施例11に記述したように調製した「プラセボ」粒子（DPPC 60%、アルブミン20%、ラクトース20%）も投与した。カルバコール負荷後の気道抵抗を吸入後8時間と吸入後15時間の時点で測定した。気道抵抗は、 $1.0 \pm 0.3$ および $1.0 \pm 0.2$  cm H<sub>2</sub>O/ml/秒で、図8に認められる気管支拡張が緩慢なアルブテロール放出

によるものであることが明らかになった。

緩慢なアルブテロール放出は、DPPC 10%、アルブミン86%およびアルブテロール4%を用いて実施例7の方法で調製した粒子を使ってイン・ビトロでも達成された。しかし、DPPC 10%、アルブミン43%、ラクトース43%およびアルブテロール4%を用いて調製した粒子はイン・ビトロで有意に遅いアルブテロール放出を示さなかったことから、DPPC含量が比較的低い場合は、高いアルブミン含量が持続的なアルブテロール放出に好ましいことが示された。

これらの実施例は噴霧乾燥物質の組成物を選択し、噴霧乾燥パラメーターを変更することにより、吸入用粒子の空気力学的特性を効果的に制御できることを証明している。より具体的には、噴霧乾燥物質の組成物は、とりわけ粒子の密度と形状に影響を及ぼし、一方、噴霧乾燥パラメーターはそのサイズにより強い影響を持つ。例えば粒子中のラクトースの比率を上げると粒子は重くなり、一方アルブミンまたはジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）含有量の増加は、それらを軽くする。DPPC含有量の増加は粒子サイズをも増大させる。それにもかかわらず、比較的低い比率の薬物を粒子に取り込む場合は、粒子の特徴が比較的影響を受けずに維持される。吸入口温度の低下は、粒子のタップ密度にはあまり影響することなく粒子のサイズを著しく増大させる。供給速度の上昇と圧縮空気の



圧力の低下は、共に粒子の密度にあまり影響することなく粒子のサイズを増大させる傾向がある。しかし、これらの効果は温度の効果よりも小さい。

【図1】

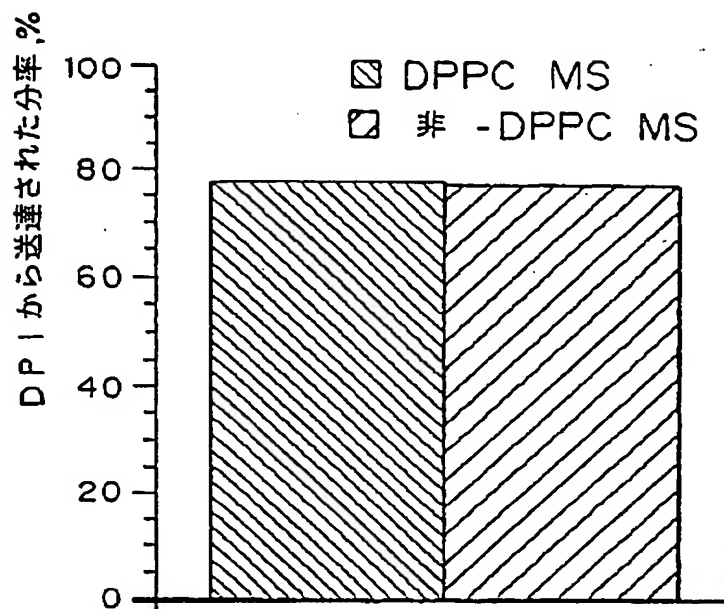


FIG. 1

【図2】

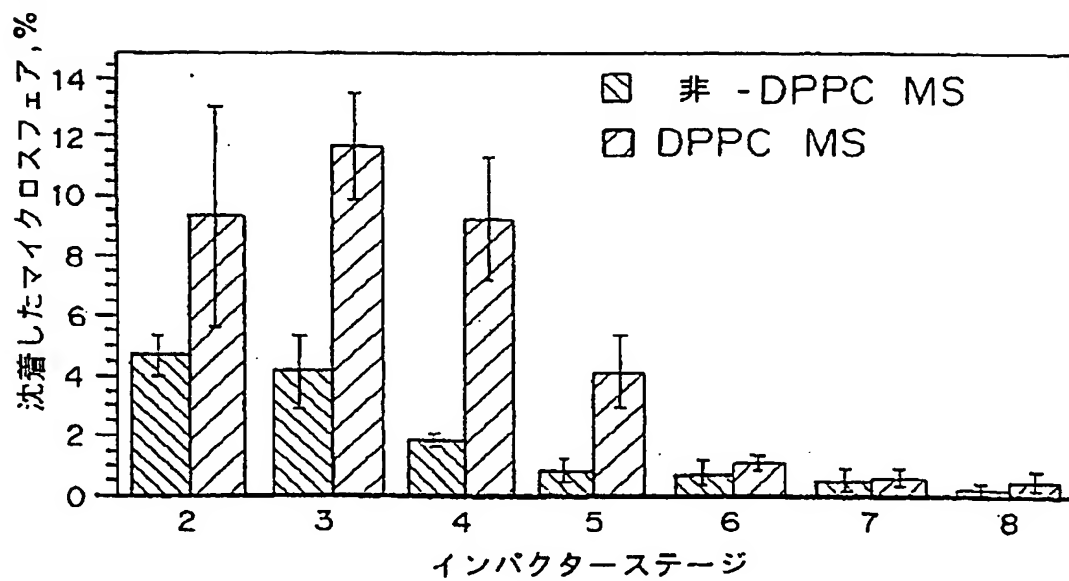


FIG. 2

【図 3】

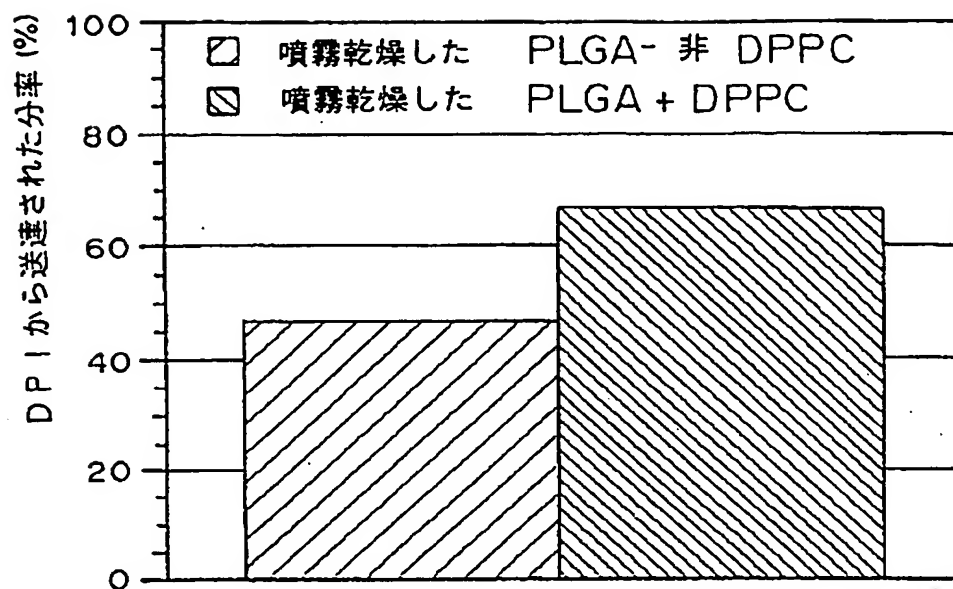


FIG. 3

【図 4】

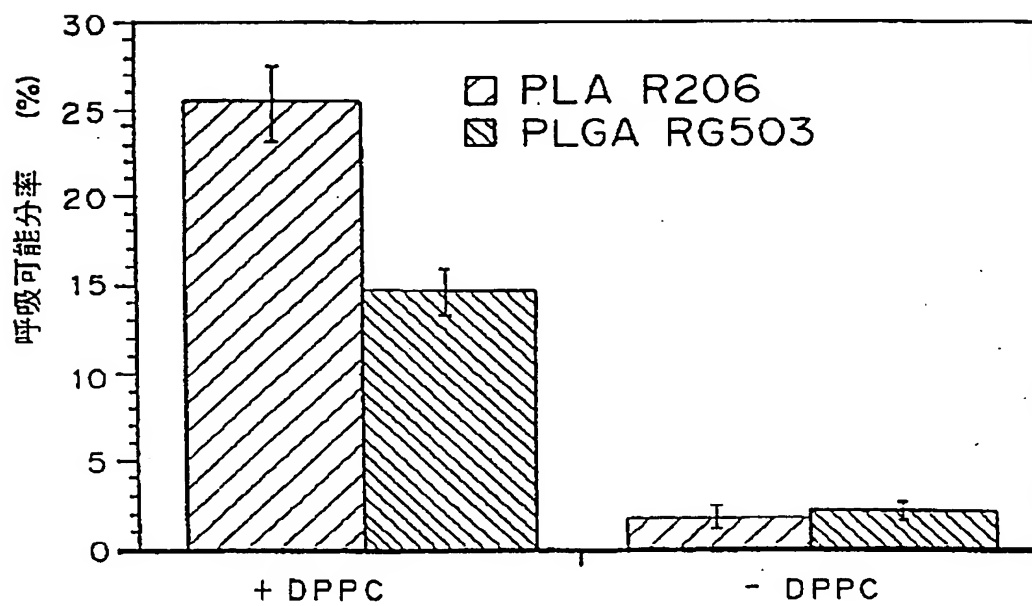


FIG. 4

【図5】

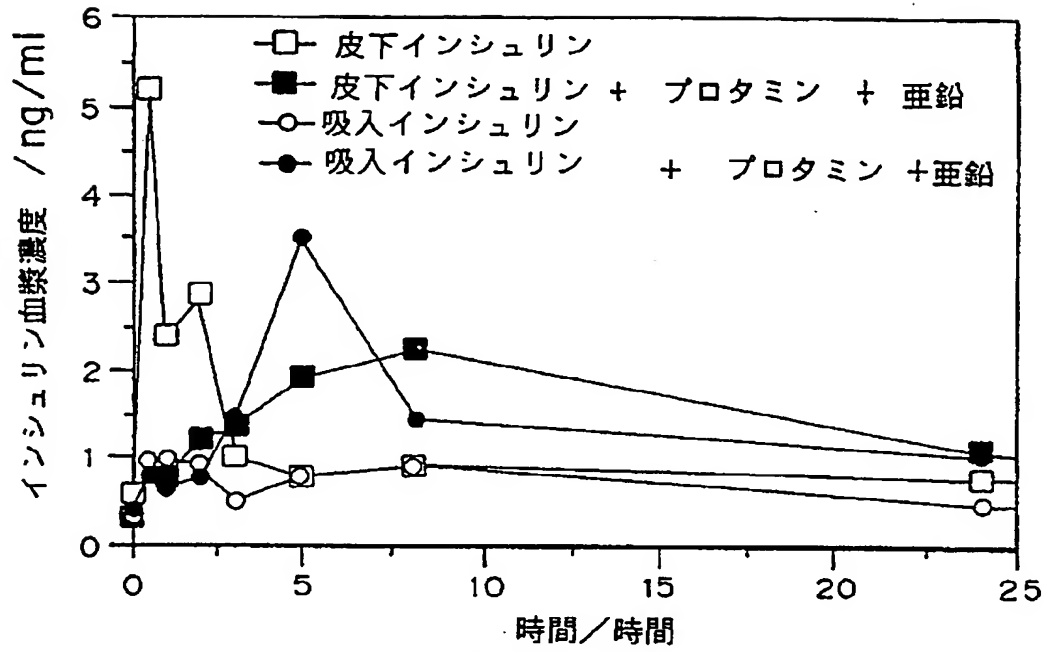


FIG. 5

【図6】

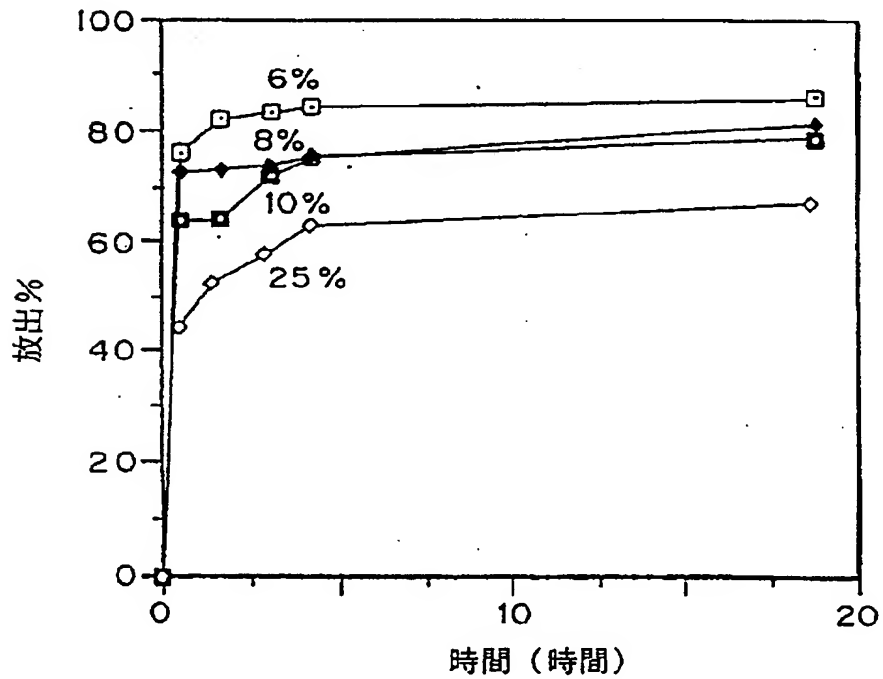


FIG. 6

【図7】

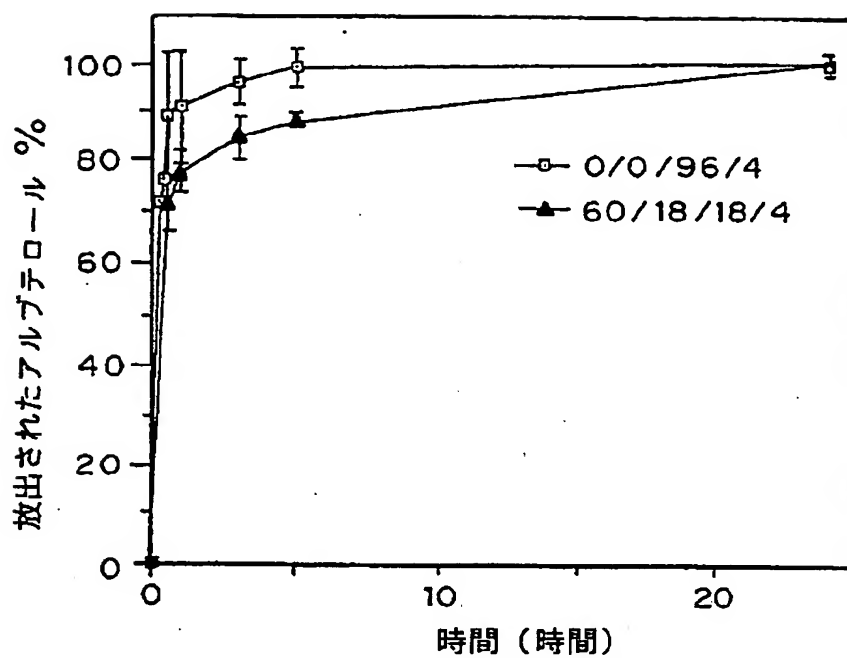


FIG. 7.

【図8】

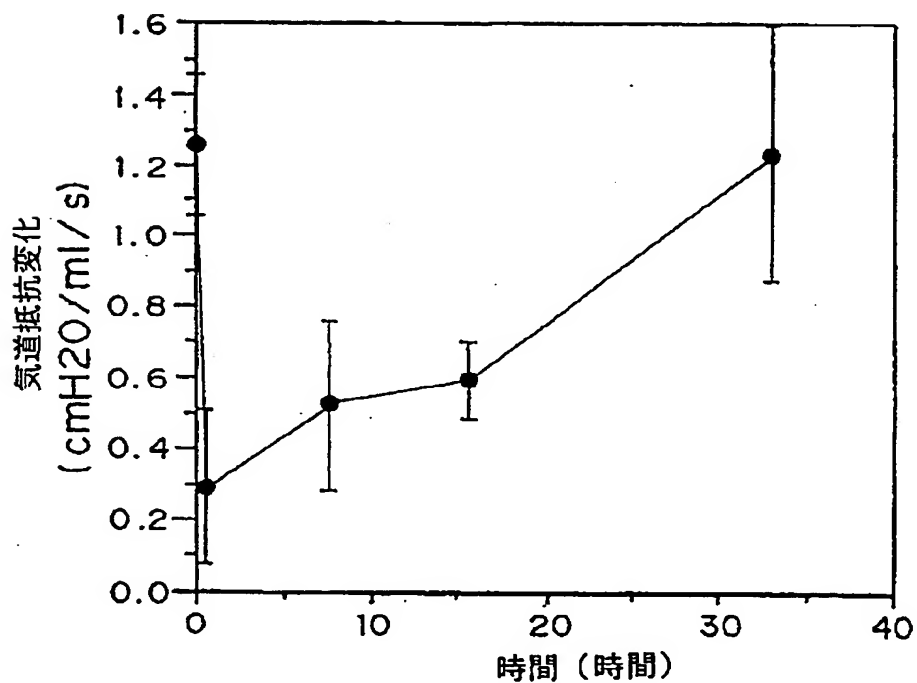


FIG. 8

## 【手続補正書】

【提出日】平成13年2月28日（2001. 2. 28）

## 【補正内容】

請求の範囲

1. 治療薬および界面活性剤を取り込んだ生体適合性粒子を含有してなる、肺系への薬物送達用微粒子組成物であつて、該粒子は、約1～5ミクロンの空気力学的直径の粒子を与えるのに有効な $0.4\text{ g/cm}^3$ 未満のタップ密度および $5\text{ }\mu\text{m}\sim 30\text{ }\mu\text{m}$ の平均直径を有する組成物。
2. 治療薬および界面活性剤で形成された粒子を含有してなる、肺系への送達用組成物であつて、該界面活性剤は、該粒子の全重量の60%を越える構成要素である組成物。
3. 該粒子の空気力学的直径が約1～3ミクロンである請求項1または2記載の組成物。
4. 該粒子の少なくとも50%が、 $3\text{ }\mu\text{m}\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ の空気力学的直径および $0.2\text{ g/cm}^3$ 未満のタップ密度を有する請求項1または2記載の組成物。
5. 肺への投与に関して製薬上許容されうる担体をさらに含有してなる請求項1～4いずれか記載の組成物。
6. 該粒子が生分解性ポリマーを含有してなる請求項1～5いずれか記載の組成物。
7. 該粒子が不規則な表面構造を有する請求項1～6いずれか記載の組成物。
8. 該界面活性剤を該粒子の表面に被覆した請求項1～7いずれか記載の組成物。
9. 該界面活性剤が該粒子内におよび該粒子の表面上に取り込まれた請求項1～7いずれか記載の組成物。
10. 治療薬がタンパク質、多糖、脂質、核酸およびそれらの組合せからなる群より選ばれたものである請求項1～9いずれか記載の組成物。
11. 治療薬がヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれたものである請求項1～9いずれか記載の組成物。

12. 治療薬がインシュリン、カルシトニン、ロイプロリド、顆粒球コロニー刺激因子、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、ソマトスタチン、テストステロン、プロゲステロン、エストラジオール、ニコチン、フェンタニル、ノルエスデロン、クロニジン、スコポロミン、サリチラート、クロモリンナトリウム、サルメテロール、ホルメテロール、バリウムおよびアルブテロールからなる群より選ばれたものである請求項10記載の組成物。

13. 該界面活性剤が脂肪酸、リン脂質およびブロックコポリマーからなる群より選ばれたものである請求項1～12いずれか記載の組成物。

14. 該界面活性剤がホスホグリセリドである請求項13記載の組成物。

15. 該界面活性剤がL- $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルコリンである請求項13記載の組成物。

16. 電荷種である治療薬と、該治療薬の電荷と反対の電荷を有し、該治療薬と複合体を形成する分子とを取り込んだ生体適合性粒子を含有してなる、肺系への薬物送達用微粒子組成物。

17. 該粒子が約1～5ミクロンの空気力学的直径の粒子を与えるのに有効な0.4 g/cm<sup>3</sup>未満のタップ密度および5  $\mu$ m～30  $\mu$ mの平均直径を有する、請求項16記載の組成物。

18. 該治療薬が親水性であり、該分子が疎水性部分を含み、該治療薬と該分子とが複合体を形成してなる請求項16または17記載の組成物。

19. 該治療薬が負に荷電しており、該治療薬と該分子とが親油性複合体を形成してなる請求項16または17記載の組成物。

20. 該治療薬がインシュリン、カルシトニン、ロイプロリド、顆粒球コロニー刺激因子、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、ソマトスタチン、テストステロン、プロゲステロン、エストラジオール、ニコチン、フェンタニル、ノルエスデロン、クロニジン、スコポロミン、サリチラート、クロモリンナトリウム、サルメテロール、ホルメテロール、バリウムおよびアルブテロールからなる群より選ばれたものである請求項16～19いずれか記載の組成物。

21. 荷電分子がプロタミンである請求項16または17記載の組成物。

22. 該治療薬がインシュリンであり、該分子がプロタミンであり、該複合体がさらに亜鉛を含有してなる請求項 16 または 17 記載の組成物。

23. テストステロン、プロゲステロン、エストラジオールおよびノルエステロンからなる群より選ばれた該治療薬を含有してなる、肺系への送達用組成物。

24. インシュリンまたはアルブテロールを含有してなる、肺における徐放性組成物。

25. インシュリン、プロタミンおよび亜鉛の複合体を含有してなる請求項 24 記載の組成物。

26. 請求項 1 ～ 25 いずれか記載の組成物を調製する工程を含む、肺系への送達用医薬の製造方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 97/20930

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6	A61K9/12 A61K38/28	A61K9/00 A61K38/23 A61K38/09 A61K47/48 A61K31/135
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. HANES ET AL.: "Porous dry-powder PLGA microspheres coated with lung surfactant for systemic insulin delivery via the lung" PROC. INT. SYMP. CONTROLLED RELEASED BIOACT. MATER., no. 24th, 1997, DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING, MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY, CAMBRIDGE, MA, 02139, USA, pages 57-58, XP002061402 *cf. introduction, and on page 58, right col., "conclusions"	1-38
X	US 5 306 483 A (MAUTONE ALAN J) 26 April 1994 *cf. abstract, col. 1, "background of the invention", col. 2, lines 5-26, col. 8, lines 4-23, ex. 2*	1-38
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  3 April 1998		Date of mailing of the international search report  30.04.98
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 351 eponl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Stoltner, A



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 97/20930

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 510 731 A (ABBOTT LAB) 28 October 1992 *page 2, lines 35-40, lines 45-55, page 3, lines 31-46* ---	1-38
Y	WO 95 35097 A (UNIV NOTTINGHAM ; YEH MING KUNG; COOMBES ALAN GERALD ARTHUR (GB); J) 28 December 1995 *cf. abstract, page 5, lines 15-25, page 5, lines 22-28, page 10, first para.* ---	1-38
Y	EP 0 656 206 A (SCHERING CORP) 7 June 1995 *cf. abstract, page 3, lines 23-55, page 5, lines 41-55* ---	1-38
Y	EP 0 634 166 A (HOECHST AG) 18 January 1995 *cf. col. 2, lines 38-43, col. 3, lines 10-12, col. 4, lines 20-25* ---	1-38
Y	WO 96 09814 A (ANDARIS LTD) 4 April 1996 *cf. abstract, page 5, lines 20-30, page 13, lines 3-9, page 21, ex. 8, claims 1-4, 12 and 17* -----	1-38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 97/20930

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5306483 A	26-04-94	US 5174988 A	29-12-92
		EP 0607118 A	27-07-94
		WO 9101765 A	21-02-91
EP 0510731 A	28-10-92	US 4897256 A	30-01-90
		US 4851211 A	25-07-89
		AT 137963 T	15-06-96
		CA 1300009 A	05-05-92
		DE 3751811 D	20-06-96
		DE 3751811 T	28-11-96
		DE 3785570 A	27-05-93
		DE 3785570 T	18-11-93
		EP 0275404 A	27-07-88
		ES 2089301 T	01-10-96
		JP 2533586 B	11-09-96
		JP 63211237 A	02-09-88
WO 9535097 A	28-12-95	AU 2743695 A	15-01-96
		CA 2193203 A	28-12-95
		EP 0766554 A	09-04-97
		FI 965068 A	17-02-97
		GB 2303551 A	26-02-97
		JP 9510477 T	21-10-97
		NO 965403 A	16-12-96
EP 0656206 A	07-06-95	EP 0656207 A	07-06-95
		AT 134509 T	15-03-96
		AU 2017592 A	12-01-93
		CA 2111002 A	23-12-92
		CN 1067578 A	06-01-93
		CZ 9302714 A	13-07-94
		DE 69208660 D	04-04-96
		DE 69208660 T	11-07-96
		EP 0518600 A	16-12-92
		EP 0588897 A	30-03-94
		ES 2084360 T	01-05-96
		FI 935464 A	07-12-93
		HK 185596 A	11-10-96
		HU 67449 A	28-04-95
		JP 6511235 T	15-12-94

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 97/20930

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0656206 A		MX 9202750 A	31-12-92
		NO 934500 A	09-12-93
		OA 986B A	15-08-94
		SK 140493 A	05-10-94
		WO 9222288 A	23-12-92
		US 5474759 A	12-12-95
-----			
EP 0634166 A	18-01-95	DE 4323636 A	19-01-95
		CA 2128034 A	16-01-95
		JP 7053353 A	28-02-95
		US 5663198 A	02-09-97
-----			
WO 9609814 A	04-04-96	AU 3530295 A	19-04-96
		CA 2199954 A	04-04-96
		CZ 9700924 A	13-08-97
		EP 0783298 A	16-07-97
		FI 971332 A	01-04-97
		NO 971438 A	26-03-97
		PL 319600 A	18-08-97
-----			

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K	31/4168	A 6 1 K	31/4168
	31/439		31/439
	31/445		31/445
	31/465		31/465
	31/5513		31/5513
	31/56		31/56
	31/565		31/565
	31/568		31/568
	31/57		31/57
	31/60		31/60
	31/7088		31/7088
	31/715		31/715
	38/00		47/24
	38/22		47/34
	38/23	A 6 1 P	3/10
	38/28	A 6 1 K	37/02
	47/24		37/26
	47/34		37/30
A 6 1 P	3/10		37/24
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP		
(72) 発明者	エドワーズ, デーヴィッド, エイ. アメリカ合衆国 ペンシルバニア 16803 ステート カレッジ, ハーツウィック アヴェニュー 109		
(72) 発明者	ヘインズ, ジャスティン アメリカ合衆国 メリーランド 21212 ボルティモア, ブランドン ロード 223		
(72) 発明者	エヴォラ, カルメン スペイン国 ラ ラグナ イー—38208 アイザック アルベニス ストリート 22		
(72) 発明者	ランガー, ロバート, エス. アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02158 ニュートン, ロンバード ストリート 77		
(72) 発明者	ヴァンビヴァー, リタ アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139 ケンブリッジ, センター ストリート ナンバー 3 11		
(72) 発明者	ミンチェス, ジェフリー アメリカ合衆国 ペンシルバニア 16801 ステート カレッジ, イー. ビーヴァー アヴェニュー 421, アpartment ナンバーエイ—12		

(72)発明者 ワン, ユエ  
アメリカ合衆国 ペンシルバニア 16801  
ステート カレッジ, サウスゲート ド  
ライブ 869

(72)発明者 チェン, ドンハオ  
アメリカ合衆国 ペンシルバニア 16801  
ステート カレッジ, サウス アレン  
ストリート ナンバー408 1013

**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 9/12, 9/00, 9/16, 47/48, 47/14, 38/28, 38/23, 38/09, 31/135</b>	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 98/31346</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 23 July 1998 (23.07.98)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US97/20930 <b>(22) International Filing Date:</b> 17 November 1997 (17.11.97)  <b>(30) Priority Data:</b> 784,421 16 January 1997 (16.01.97) US 60/059,004 15 September 1997 (15.09.97) US  <b>(71) Applicants:</b> MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY [US/US]; 11 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 (US). THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION [US/US]; 207 Old Main, University Park, PA 16802 (US).  <b>(72) Inventors:</b> EDWARDS, David, A.; 109 Hartswick Avenue, State College, PA 16803 (US). HANES, Justin; 223 Brandon Road, Baltimore, MD 21212 (US). EVORA, Carmen; 22 Isaac Albeniz Street, E-38208 La Laguna (ES). LANGER, Robert, S.; 77 Lombard Street, Newton, MA 02158 (US). VANBEVER, Rita; 11 Centre Street #3, Cambridge, MA 02139 (US). MINTZES, Jeffrey; Apartment #A-12, 421 E. Beaver Avenue, State College, PA 16801 (US). WANG, Jue; 869 Southgate Drive, State College, PA 16801 (US). CHEN, Donghao; 1013 South Allen Street #408, State College, PA 16801 (US).	<b>(74) Agent:</b> PABST, Patrea, L.; Arnall Golden & Gregory, LLP, 2800 One Atlantic Center, 1201 West Peachtree Street, Atlanta, GE 30309-3450 (US).  <b>(81) Designated States:</b> CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i> <i>With amended claims.</i>	
<b>(54) Title:</b> PREPARATION OF PARTICLES FOR INHALATION		
<b>(57) Abstract</b> <p>Particles incorporating a surfactant and/or a hydrophilic or hydrophobic complex of a positively or negatively charged therapeutic agent and a charged molecule of opposite charge for drug delivery to the pulmonary system, and methods for their synthesis and administration are provided. In a preferred embodiment, the particles are made of a biodegradable material and have a tap density less than 0.4 g/cm<sup>3</sup> and a mass mean diameter between 5 µm and 30 µm, which together yield an aerodynamic diameter of the particles of between approximately one and three microns. The particles may be formed of biodegradable materials such as biodegradable polymers. For example, the particles may be formed of poly(lactic acid) or poly(glycolic acid) or copolymers thereof. Alternatively, the particles may be formed solely of a therapeutic or diagnostic agent and a surfactant. Surfactants can be incorporated on the particule surface for example by coating the particle after particle formation, or by incorporating the surfactant in the material forming the particle prior to formation of the particle. Exemplary surfactants include phosphoglycerides such as dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC). The particles can be effectively aerosolized for administration to the respiratory tract to permit systemic or local delivery of wide a variety of therapeutic agents. Formation of complexes of positively or negatively charged therapeutic agents with molecules of opposite charge can allow control of the release rate of the agents into the blood stream following administration.</p>		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

## PREPARATION OF PARTICLES FOR INHALATION

### Background of the Invention

The present application relates generally to particles for use in drug delivery to the pulmonary system.

5           Aerosols for the delivery of therapeutic agents to the respiratory tract have been described, for example, Adjei, A. and Garren, J. *Pharm. Res.*, 7: 565-569 (1990); and Zanen, P. and Lamm, J.-W.J. *Int. J. Pharm.*, 114: 111-115 (1995). The respiratory tract encompasses the upper airways, including the oropharynx and larynx, followed by the  
10   lower airways, which include the trachea followed by bifurcations into the bronchi and bronchioli. The upper and lower airways are called the conducting airways. The terminal bronchioli then divide into respiratory bronchioli which then lead to the ultimate respiratory zone, the alveoli, or deep lung. Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic  
15   agents to the respiratory tract," in *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:273-313 (1990). The deep lung, or alveoli, are the primary target of inhaled therapeutic aerosols for systemic drug delivery.

Inhaled aerosols have been used for the treatment of local lung disorders including asthma and cystic fibrosis (Anderson *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140: 1317-1324 (1989)) and have potential for the systemic  
20   delivery of peptides and proteins as well (Patton and Platz, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8:179-196 (1992)). However, pulmonary drug delivery strategies present many difficulties for the delivery of macromolecules; these include protein denaturation during aerosolization,  
25   excessive loss of inhaled drug in the oropharyngeal cavity (often exceeding 80%), poor control over the site of deposition, lack of reproducibility of therapeutic results owing to variations in breathing patterns, the frequent too-rapid absorption of drug potentially resulting in local toxic effects, and phagocytosis by lung macrophages.



Considerable attention has been devoted to the design of therapeutic aerosol inhalers to improve the efficiency of inhalation therapies. Timsina *et. al.*, *Int. J. Pharm.*, 101: 1-13 (1995); and Tansey, I.P., *Spray Technol. Market*, 4: 26-29 (1994). Attention has also been  
5 given to the design of dry powder aerosol surface texture, regarding particularly the need to avoid particle aggregation, a phenomenon which considerably diminishes the efficiency of inhalation therapies. French, D.L., Edwards, D.A. and Niven, R.W., *J. Aerosol Sci.*, 27: 769-783 (1996). Dry powder formulations ("DPFs") with large particle size have  
10 improved flowability characteristics, such as less aggregation (Visser, J., *Powder Technology* 58: 1-10 (1989)), easier aerosolization, and potentially less phagocytosis. Rudt, S. and R.H. Muller, *J. Controlled Release*, 22: 263-272 (1992); Tabata, Y. and Y. Ikada, *J. Biomed. Mater. Res.*, 22: 837-858 (1988). Dry powder aerosols for inhalation therapy are  
15 generally produced with mean diameters primarily in the range of less than 5  $\mu\text{m}$ . Ganderton, D., *J. Biopharmaceutical Sciences*, 3:101-105 (1992); and Gonda, I. "Physico-Chemical Principles in Aerosol Delivery," in *Topics in Pharmaceutical Sciences 1991*, Crommelin, D.J. and K.K. Midha, Eds., Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, pp. 95-  
20 115, 1992. Large "carrier" particles (containing no drug) have been co-delivered with therapeutic aerosols to aid in achieving efficient aerosolization among other possible benefits. French, D.L., Edwards, D.A. and Niven, R.W., *J. Aerosol Sci.*, 27: 769-783 (1996).

The human lungs can remove or rapidly degrade hydrolytically  
25 cleavable deposited aerosols over periods ranging from minutes to hours. In the upper airways, ciliated epithelia contribute to the "mucociliary escalator" by which particles are swept from the airways toward the mouth. Pavia, D. "Lung Mucociliary Clearance," in *Aerosols and the Lung: Clinical and Experimental Aspects*, Clarke, S.W. and Pavia, D.,  
30 Eds., Butterworths, London, 1984. Anderson *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140: 1317-1324 (1989). In the deep lungs, alveolar macrophages are capable of phagocytosing particles soon after their deposition.

- Warheit, M.B. and Hartsy, M.A., *Microscopy Res. Tech.*, 26: 412-422 (1993); Brain, J.D., "Physiology and Pathophysiology of Pulmonary Macrophages," in *The Reticuloendothelial System*, S.M. Reichard and J. Filkins, Eds., Plenum, New York, pp. 315-327, 1985; Dorries, A.M. and Valberg, P.A., *Am. Rev. Resp. Disease* 146: 831-837 (1991); and Gehr, P. *et al. Microscopy Res. and Tech.*, 26: 423-436 (1993). As the diameter of particles exceeds 3  $\mu\text{m}$ , there is increasingly less phagocytosis by macrophages. Kawaguchi, H. *et al.*, *Biomaterials* 7: 61-66 (1986); Krenis, L.J. and Strauss, B., *Proc. Soc. Exp. Med.*, 107: 748-750 (1961); and Rudt, S. and Muller, R.H., *J. Contr. Rel.*, 22: 263-272 (1992). However, increasing the particle size also has been found to minimize the probability of particles (possessing standard mass density) entering the airways and acini due to excessive deposition in the oropharyngeal or nasal regions. Heyder, J. *et al.*, *J. Aerosol Sci.*, 17: 811-825 (1986).
- Local and systemic inhalation therapies can often benefit from a relatively slow controlled release of the therapeutic agent. Gonda, I., "Physico-chemical principles in aerosol delivery," in: *Topics in Pharmaceutical Sciences 1991*, D.J.A. Crommelin and K.K. Midha, Eds., Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, pp. 95-117 (1992).
- Slow release from a therapeutic aerosol can prolong the residence of an administered drug in the airways or acini, and diminish the rate of drug appearance in the bloodstream. Also, patient compliance is increased by reducing the frequency of dosing. Langer, R., *Science*, 249: 1527-1533 (1990); and Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 6:273-313 (1990).

- Controlled release drug delivery to the lung may simplify the way in which many drugs are taken. Gonda, I., *Adv. Drug Del. Rev.*, 5: 1-9 (1990); and Zeng, X. *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 124: 149-164 (1995).
- Pulmonary drug delivery is an attractive alternative to oral, transdermal, and parenteral administration because self-administration is simple, the lungs provide a large mucosal surface for drug absorption, there is no

first-pass liver effect of absorbed drugs, and there is reduced enzymatic activity and pH mediated drug degradation compared with the oral route. Relatively high bioavailability of many molecules, including macromolecules, can be achieved via inhalation. Wall, D.A., *Drug Delivery*, 2: 1-20 (1995); Patton, J. and Platz, R., *Adv. Drug Del. Rev.*, 8: 179-196 (1992); and Byron, P., *Adv. Drug. Del. Rev.*, 5: 107-132 (1990). As a result, several aerosol formulations of therapeutic drugs are in use or are being tested for delivery to the lung. Patton, J.S., *et al.*, *J. Controlled Release*, 28: 79-85 (1994); Damms, B. and Bains, W., *Nature Biotechnology* (1996); Niven, R.W., *et al.*, *Pharm. Res.*, 12(9): 1343-1349 (1995); and Kobayashi, S., *et al.*, *Pharm. Res.*, 13(1): 80-83 (1996).

Drugs currently administered by inhalation come primarily as liquid aerosol formulations. However, many drugs and excipients, especially proteins, peptides (Liu, R., *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 37: 177-184 (1991)), and biodegradable carriers such as poly(lactide-*co*-glycolides) (PLGA), are unstable in aqueous environments for extended periods of time. This can make storage as a liquid formulation problematic. In addition, protein denaturation can occur during aerosolization with liquid formulations. Mumenthaler, M., *et al.*, *Pharm. Res.*, 11: 12-20 (1994). Considering these and other limitations, dry powder formulations (DPF's) are gaining increased interest as aerosol formulations for pulmonary delivery. Damms, B. and W. Bains, *Nature Biotechnology* (1996); Kobayashi, S., *et al.*, *Pharm. Res.*, 13(1): 80-83 (1996); and Timsina, M., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 101: 1-13 (1994). However, among the disadvantages of DPF's is that powders of ultrafine particulates usually have poor flowability and aerosolization properties, leading to relatively low respirable fractions of aerosol, which are the fractions of inhaled aerosol that escape deposition in the mouth and throat. Gonda, I., in *Topics in Pharmaceutical Sciences 1991*, D. Crommelin and K. Midha, Editors, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 95-117 (1992). A primary concern with many aerosols is

particulate aggregation caused by particle-particle interactions, such as hydrophobic, electrostatic, and capillary interactions. An effective dry-powder inhalation therapy for both short and long term release of therapeutics, either for local or systemic delivery, requires a powder that  
5 displays minimum aggregation, as well as a means of avoiding or suspending the lung's natural clearance mechanisms until drugs have been effectively delivered.

There is a need for improved inhaled aerosols for pulmonary delivery of therapeutic agents. There is a need for the development of  
10 drug carriers which are capable of delivering the drug in an effective amount into the airways or the alveolar zone of the lung. There further is a need for the development of drug carriers for use as inhaled aerosols which are biodegradable and are capable of controlled release of drug within the airways or in the alveolar zone of the lung. There also is a  
15 need for particles for pulmonary drug delivery with improved aerosolization properties.

It is therefore an object of the present invention to provide improved carriers for the pulmonary delivery of therapeutic agents. It is a further object of the invention to provide inhaled aerosols which are  
20 effective carriers for delivery of therapeutic agents to the deep lung. It is another object of the invention to provide carriers for pulmonary delivery which avoid phagocytosis in the deep lung. It is a further object of the invention to provide carriers for pulmonary drug delivery which are capable of biodegrading and releasing the drug at a controlled rate. It is  
25 yet another object of the invention to provide particles for pulmonary drug delivery with improved aerosolization properties and optimized particle - particle interactions.

### Summary of the Invention

Particles incorporating a surfactant and/or a hydrophilic or  
30 hydrophobic complex of a positively or negatively charged therapeutic agent and a charged molecule of opposite charge for delivery of

therapeutic or diagnostic agents to the pulmonary system, and methods for their synthesis and administration, are provided. Exemplary surfactants include naturally occurring phosphatidylcholines, such as dipalmitoylphosphatidylcholine ("DPPC"). Exemplary hydrophilic or hydrophobic complexes include insulin (negatively charged) and protamine (positively charged). In a preferred embodiment, the particles are aerodynamically light particles, which are made of a biodegradable material, and have a tap density less than  $0.4 \text{ g/cm}^3$ . The "aerodynamically light" particles generally have a mean diameter between  $5 \mu\text{m}$  and  $30 \mu\text{m}$ . The tap density less than  $0.4 \text{ g/cm}^3$  and mean diameter between  $5 \mu\text{m}$  and  $30 \mu\text{m}$ , are designed to yield particles with an aerodynamic diameter between approximately one and five microns, preferably between approximately one and three microns. The particles may be formed of biodegradable materials such as biodegradable polymers, proteins, or other water soluble or non-water soluble materials. Particles can also be formed of water-soluble excipients, such as trehalose or lactose, or proteins, such as the proteins to be delivered. In one embodiment, the particles include only a therapeutic or diagnostic agent to be delivered to a patient in a complex with another charged molecule. In a second embodiment, the particles include only the agent and a surfactant. In a third embodiment, particles include surfactant and charged molecules forming a complex, which provides for sustained release.

The particles can be used for enhanced delivery of a therapeutic agent to the airways or the alveolar region of the lung. The particles may be effectively aerosolized for administration to the respiratory tract to permit systemic or local delivery of a wide variety of therapeutic agents. They also optionally may be co-delivered with larger carrier particles, not carrying a therapeutic agent, having, for example, a mean diameter ranging between about  $50 \mu\text{m}$  and  $100 \mu\text{m}$ . The particles can be used to form a composition that includes the particles and a pharmaceutically

acceptable carrier for administration to a patient, preferably for administration via inhalation.

### Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a graph comparing the mass fraction of the initial dose  
5 that is released from a dry powder inhaler device, after *in vitro*  
aerosolization of poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) ("PLGA")  
microspheres made by a double emulsion procedure with and without the  
incorporation of L- $\alpha$ -phosphatidylcholine dipalmitoyl ("DPPC").

Figure 2 is a graph comparing the mass fraction of the aerosolized  
10 dose that is deposited in different stages of a cascade impactor after *in vitro*  
aerosolization of PLGA microspheres made by a double emulsion  
procedure with and without the incorporation of DPPC.

Figure 3 is a graph showing the aerosolization behavior of PLGA  
microspheres made by spray drying with and without the incorporation of  
15 DPPC showing the mass-fraction of the initial dose that is released from  
the dry powder inhaler device after *in vitro* aerosolization.

Figure 4 is a graph comparing the *in vitro* aerosolization behaviors  
of PLA and PLGA microspheres made by spray drying with and without  
the incorporation of DPPC showing the mass-fraction of the aerosolized  
20 dose that is deposited in stages of a cascade impactor corresponding to the  
"respirable-fraction".

Figure 5 is a graph comparing the plasma concentration of insulin  
(ng/ml) per unit time (hrs).

Figure 6 is a graph comparing the release of albuterol (%) over  
25 time (hrs).

Figure 7 is a graph comparing the *in vitro* release of albuterol (%)  
over time (hrs) for compositions with varying ratios of DPPC, albumin,  
lactose and albuterol.

Figure 8 is a graph comparing the airway resistance change (cm  
30 H<sub>2</sub>O/ml/sec.) per unit time (hrs).

### Detailed Description of the Invention

Particles incorporating a surfactant and/or a hydrophilic or hydrophobic complex of a positively or negatively charged therapeutic or diagnostic agent and a charged molecule of opposite charge for delivery to the pulmonary system, and methods for their synthesis and administration are provided. The particles can, but need not include a therapeutic or diagnostic agent. In one embodiment, the particles include either only a therapeutic or diagnostic agent for delivery to a patient. In a second embodiment, the particles include a therapeutic or diagnostic the agent and a surfactant.

The particles have a tap density less than  $0.4 \text{ g/cm}^3$  and a mean diameter between  $5 \text{ }\mu\text{m}$  and  $30 \text{ }\mu\text{m}$ , which in combination yield an aerodynamic diameter of between one and five microns, preferably between one and three microns. The aerodynamic diameter is calculated to provide for maximum deposition within the lungs, previously achieved by the use of very small particles of less than five microns in diameter, preferably between one and three microns, which are then subject to phagocytosis. Selection of particles which have a larger diameter, but which are sufficiently light (hence the characterization "aerodynamically light"), results in an equivalent delivery to the lungs, but the larger size particles are not phagocytosed. Improved delivery can be obtained by using particles with a rough or uneven surface relative to those with a smooth surface. The presence of a surfactant minimizes aggregation of the particles. The presence of a complex of the therapeutic agent with a molecule of opposite charge provides for sustained release of the agent.

The particles can be used for controlled systemic or local delivery of therapeutic or diagnostic agents to the respiratory tract via aerosolization. Administration of the particles to the lung by aerosolization permits deep lung delivery of relatively large diameter therapeutic aerosols, for example, greater than  $5 \text{ }\mu\text{m}$  in mean diameter. The particles can be fabricated with a rough surface texture to reduce particle agglomeration and improve flowability of the powder. The

particles have improved aerosolization properties. The particle can be fabricated with features which enhance aerosolization via dry powder inhaler devices, and lead to lower deposition in the mouth, throat and inhaler device.

- 5           The particles can be used to form a composition that includes the particles and a pharmaceutically acceptable carrier for administration to a patient, preferably for administration via inhalation. Suitable carriers include those typically used for inhalation therapy. Those of skill in the art can readily determine an appropriate pharmaceutically acceptable  
10 carrier for use in administering particles via inhalation.

#### **Particle Materials**

- The particles can be prepared entirely from a therapeutic or diagnostic agent, or from a combination of the agent and a surfactant. The particles preferably are biodegradable and biocompatible, and  
15 optionally are capable of biodegrading at a controlled rate for delivery of a therapeutic or diagnostic agent. The particles can be made of a variety of materials. Both inorganic and organic materials can be used. For example, ceramics may be used. Polymeric and non-polymeric materials, such as fatty acids, may be used to form aerodynamically light particles.  
20 Other suitable materials include, but are not limited to, gelatin, polyethylene glycol, trehalose, and dextran. Particles with degradation and release times ranging from seconds to months can be designed and fabricated, based on factors such as the particle material. Different properties of the particle which can contribute to the aerodynamic  
25 lightness include the composition forming the particle, and the presence of irregular surface structure, or pores or cavities within the particle.

#### *Polymeric Particles*

- Polymeric particles may be formed from any biocompatible, and preferably biodegradable polymer, copolymer, or blend. Preferred  
30 polymers are those which are capable of forming aerodynamically light particles having a tap density less than about 0.4 g/cm<sup>3</sup>, a mean diameter between 5  $\mu$ m and 30  $\mu$ m and an aerodynamic diameter between



approximately one and five microns, preferably between one and three microns. The polymers may be tailored to optimize different characteristics of the particle including: i) interactions between the agent to be delivered and the polymer to provide stabilization of the agent and retention of activity upon delivery; ii) rate of polymer degradation and, thereby, rate of drug release profiles; iii) surface characteristics and targeting capabilities via chemical modification; and iv) particle porosity.

Surface eroding polymers such as polyanhydrides may be used to form the particles. For example, polyanhydrides such as poly[(*p*-carboxyphenoxy)-hexane anhydride] (PCPH) may be used. Biodegradable polyanhydrides are described in U.S. Patent No. 4,857,311.

In another embodiment, bulk eroding polymers such as those based on polyesters including poly(hydroxy acids) can be used. For example, polyglycolic acid (PGA), polylactic acid (PLA), or copolymers thereof may be used to form the particles. The polyester may also have a charged or functionalizable group, such as an amino acid. In a preferred embodiment, particles with controlled release properties can be formed of poly(D,L-lactic acid) and/or poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) ("PLGA") which incorporate a surfactant such as DPPC.

Other polymers include polyamides, polycarbonates, polyalkylenes such as polyethylene, polypropylene, poly(ethylene glycol), poly(ethylene oxide), poly(ethylene terephthalate), poly vinyl compounds such as polyvinyl alcohols, polyvinyl ethers, and polyvinyl esters, polymers of acrylic and methacrylic acids, celluloses and other polysaccharides, and peptides or proteins, or copolymers or blends thereof. Polymers may be selected with or modified to have the appropriate stability and degradation rates *in vivo* for different controlled drug delivery applications.

In one embodiment, aerodynamically light particles are formed from functionalized polyester graft copolymers, as described in Hrkach *et al.*, *Macromolecules*, 28:4736-4739 (1995); and Hrkach *et al.*, "Poly(L-Lactic acid-co-amino acid) Graft Copolymers: A Class of Functional Biodegradable Biomaterials" in *Hydrogels and Biodegradable Polymers*

*for Bioapplications*, ACS Symposium Series No. 627, Raphael M. Ottenbrite *et al.*, Eds., American Chemical Society, Chapter 8, pp. 93-101, 1996.

Materials other than biodegradable polymers may be used to form the particles. Suitable materials include various non-biodegradable polymers and various excipients. The particles also may be formed of a therapeutic or diagnostic agent and surfactant alone. In one embodiment, the particles may be formed of the surfactant and include a therapeutic or diagnostic agent, to improve aerosolization efficiency due to reduced particle surface interactions, and to potentially reduce loss of the agent due to phagocytosis by alveolar macrophages.

#### *Excipients*

In addition to a therapeutic or diagnostic agent (or possibly other desired molecules for delivery), the particles can include, and preferably, do include, one or more of the following excipients; a sugar, such as lactose, a protein, such as albumin, and/or a surfactant.

#### *Complex Forming Materials*

If the agent to be delivered is negatively charged (such as insulin), protamine or other positively charged molecules can be added to provide a lipophilic complex which results in the sustained release of the negatively charged agent. Negatively charged molecules can be used to render insoluble positively charged agents.

#### *Surfactants*

Surfactants which can be incorporated into particles to improve their aerosolization properties include phosphoglycerides. Exemplary phosphoglycerides include phosphatidylcholines, such as the naturally occurring surfactant, L- $\alpha$ -phosphatidylcholine dipalmitoyl ("DPPC"). The surfactants advantageously improve surface properties by, for example, reducing particle-particle interactions, and can render the surface of the particles less adhesive. The use of surfactants endogenous to the lung may avoid the need for the use of non-physiologic surfactants.

As used herein, the term "surfactant" refers to any agent which preferentially absorbs to an interface between two immiscible phases, such as the interface between water and an organic polymer solution, a water/air interface or organic solvent/air interface. Surfactants generally possess a hydrophilic moiety and a lipophilic moiety, such that, upon absorbing to microparticles, they tend to present moieties to the external environment that do not attract similarly-coated particles, thus reducing particle agglomeration. Surfactants may also promote absorption of a therapeutic or diagnostic agent and increase bioavailability of the agent.

As used herein, a particle "incorporating a surfactant" refers to a particle with a surfactant on at least the surface of the particle. The surfactant may be incorporated throughout the particle and on the surface during particle formation, or may be coated on the particle after particle formation. The surfactant can be coated on the particle surface by adsorption, ionic or covalent attachment, or physically "entrapped" by the surrounding matrix. The surfactant can be, for example, incorporated into controlled release particles, such as polymeric microspheres.

Providing a surfactant on the surfaces of the particles can reduce the tendency of the particles to agglomerate due to interactions such as electrostatic interactions, Van der Waals forces, and capillary action. The presence of the surfactant on the particle surface can provide increased surface rugosity (roughness), thereby improving aerosolization by reducing the surface area available for intimate particle-particle interaction. The use of a surfactant which is a natural material of the lung can potentially reduce opsonization (and thereby reducing phagocytosis by alveolar macrophages), thus providing a longer-lived controlled release particle in the lung.

Surfactants known in the art can be used including any naturally occurring surfactant. Other exemplary surfactants include diphosphatidyl glycerol (DPPG); hexadecanol; fatty alcohols such as polyethylene glycol (PEG); polyoxyethylene-9-lauryl ether; a surface active fatty acid, such as palmitic acid or oleic acid; sorbitan trioleate (Span 85); glycocholate;

surfactin; a poloxomer; a sorbitan fatty acid ester such as sorbitan trioleate; tyloxapol and a phospholipid.

#### *Materials Enhancing Sustained Release*

If the molecules are hydrophilic and tend to solubilize readily in an aqueous environment, another method for achieving sustained release is to use cholesterol or very high surfactant concentration. This complexation methodology also applies to particles that are not aerodynamically light.

#### **Formation of Particles**

##### *Formation of Polymeric Particles*

Polymeric particles may be prepared using single and double emulsion solvent evaporation, spray drying, solvent extraction, solvent evaporation, phase separation, simple and complex coacervation, interfacial polymerization, and other methods well known to those of ordinary skill in the art. Particles may be made using methods for making microspheres or microcapsules known in the art, provided that the conditions are optimized for forming particles with the desired aerodynamic diameter, or additional steps are performed to select particles with the density and diameter sufficient to provide the particles with an aerodynamic diameter between one and five microns, preferably between one and three microns.

Methods developed for making microspheres for delivery of encapsulated agents are described in the literature, for example, as described in Doubrow, M., Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992. Methods also are described in Mathiowitz and Langer, *J. Controlled Release* 5,13-22 (1987); Mathiowitz *et al.*, *Reactive Polymers* 6, 275-283 (1987); and Mathiowitz *et al.*, *J. Appl. Polymer Sci.* 35, 755-774 (1988). The selection of the method depends on the polymer selection, the size, external morphology, and crystallinity that is desired, as described, for example, by Mathiowitz *et al.*, *Scanning Microscopy* 4: 329-340 (1990); Mathiowitz *et al.*, *J. Appl. Polymer Sci.* 45, 125-134 (1992); and Benita *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 73, 1721-1724 (1984).

In solvent evaporation, described for example, in Mathiowitz *et al.*, (1990), Benita; and U.S. Patent No. 4,272,398 to Jaffe, the polymer is dissolved in a volatile organic solvent, such as methylene chloride. Several different polymer concentrations can be used, for example, between 0.05 and 1.0 g/ml. The therapeutic or diagnostic agent, either in soluble form or dispersed as fine particles, is added to the polymer solution, and the mixture is suspended in an aqueous phase that contains a surface active agent such as poly(vinyl alcohol). The aqueous phase may be, for example, a concentration of 1% poly(vinyl alcohol) w/v in distilled water. The resulting emulsion is stirred until most of the organic solvent evaporates, leaving solid microspheres, which may be washed with water and dried overnight in a lyophilizer. Microspheres with different sizes (between 1 and 1000 microns) and morphologies can be obtained by this method.

Solvent removal was primarily designed for use with less stable polymers, such as the polyanhydrides. In this method, the agent is dispersed or dissolved in a solution of a selected polymer in a volatile organic solvent like methylene chloride. The mixture is then suspended in oil, such as silicon oil, by stirring, to form an emulsion. Within 24 hours, the solvent diffuses into the oil phase and the emulsion droplets harden into solid polymer microspheres. Unlike the hot-melt microencapsulation method described for example in Mathiowitz *et al.*, *Reactive Polymers*, 6:275 (1987), this method can be used to make microspheres from polymers with high melting points and a wide range of molecular weights. Microspheres having a diameter for example between one and 300 microns can be obtained with this procedure.

With some polymeric systems, polymeric particles prepared using a single or double emulsion technique vary in size depending on the size of the droplets. If droplets in water-in-oil emulsions are not of a suitably small size to form particles with the desired size range, smaller droplets can be prepared, for example, by sonication or homogenation of the emulsion, or by the addition of surfactants.

If the particles prepared by any of the above methods have a size range outside of the desired range, particles can be sized, for example, using a sieve, and further separated according to density using techniques known to those of skill in the art.

- 5           The polymeric particles are preferably prepared by spray drying. Prior methods of spray drying, such as that disclosed in PCT WO 96/09814 by Sutton and Johnson, disclose the preparation of smooth, spherical microparticles of a water-soluble material with at least 90% of the particles possessing a mean size between 1 and 10  $\mu\text{m}$ . The method  
10       disclosed herein provides rough (non-smooth), non-spherical microparticles that include a water-soluble material combined with a water-insoluble material. At least 90% of the particles possess a mean size between 5 and 30  $\mu\text{m}$ , and a low mass or tap density (less than 0.4 g/cc).  
15           The particles can incorporate various complexes of therapeutic or diagnostic agents to be delivered with molecules of an opposite charge, or can include substances such as lipids which allow for the sustained release of small and large molecules. Addition of these complexes or substances  
20       is applicable to particles of any size and shape, and is especially useful for altering the rate of release of therapeutic agents from inhaled particles.

#### **Aerodynamically Light Particles**

- Aerodynamically light particles, having a tap density less than about 0.4 g/cm<sup>3</sup> and an aerodynamic diameter between one and five microns, preferably between one and three microns, may be fabricated  
25       using the methods disclosed herein.

#### *Aerodynamically Light Particle Size*

- The mass mean diameter of the particles can be measured using a Coulter Multisizer II (Coulter Electronics, Luton, Beds, England). The aerodynamically light particles in one preferred embodiment are at least  
30       about 5 microns in diameter. The diameter of particles in a sample will range depending upon factors such as particle composition and methods of

synthesis. The distribution of size of particles in a sample can be selected to permit optimal deposition within targeted sites within the respiratory tract.

The aerodynamically light particles may be fabricated or separated, for example by filtration or centrifugation, to provide a particle sample with a preselected size distribution. For example, greater than 30%, 50%, 70%, or 80% of the particles in a sample can have a diameter within a selected range of at least 5  $\mu\text{m}$ . The selected range within which a certain percentage of the particles must fall may be for example, between about 5 and 30  $\mu\text{m}$ , or optionally between 5 and 15  $\mu\text{m}$ . In one preferred embodiment, at least a portion of the particles have a diameter between about 9 and 11  $\mu\text{m}$ . Optionally, the particle sample also can be fabricated wherein at least 90%, or optionally 95% or 99%, have a diameter within the selected range. The presence of the higher proportion of the aerodynamically light, larger diameter (at least about 5  $\mu\text{m}$ ) particles in the particle sample enhances the delivery of therapeutic or diagnostic agents incorporated therein to the deep lung.

In one embodiment, in the particle sample, the interquartile range may be 2  $\mu\text{m}$ , with a mean diameter for example, between about 7.5 and 13.5  $\mu\text{m}$ . Thus, for example, between at least 30% and 40% of the particles may have diameters within the selected range. Preferably, the said percentages of particles have diameters within a 1  $\mu\text{m}$  range, for example, between 6.0 and 7.0  $\mu\text{m}$ , 10.0 and 11.0  $\mu\text{m}$  or 13.0 and 14.0  $\mu\text{m}$ .

The aerodynamically light particles, optionally incorporating a therapeutic or diagnostic agent, with a tap density less than about 0.4  $\text{g}/\text{cm}^3$ , mean diameters of at least about 5  $\mu\text{m}$ , and an aerodynamic diameter of between one and five microns, preferably between one and three microns, are more capable of escaping inertial and gravitational deposition in the oropharyngeal region, and are targeted to the airways or the deep lung. The use of larger particles (mean diameter at least about 5  $\mu\text{m}$ ) is advantageous since they are able to aerosolize more efficiently

than smaller, denser aerosol particles such as those currently used for inhalation therapies.

In comparison to smaller, relatively denser particles, the larger (at least about 5  $\mu\text{m}$ ) aerodynamically light particles also can potentially more successfully avoid phagocytic engulfment by alveolar macrophages and clearance from the lungs, due to size exclusion of the particles from the phagocytes' cytosolic space. Phagocytosis of particles by alveolar macrophages diminishes precipitously as particle diameter increases beyond 3  $\mu\text{m}$ . Kawaguchi, H. *et al.*, *Biomaterials* 7: 61-66 (1986); Krenis, L.J. and Strauss, B., *Proc. Soc. Exp. Med.*, 107:748-750 (1961); and Rudt, S. and Muller, R.H., *J. Contr. Rel.*, 22: 263-272 (1992). For particles of statistically isotropic shape, such as spheres with rough surfaces, the particle envelope volume is approximately equivalent to the volume of cytosolic space required within a macrophage for complete particle phagocytosis.

Aerodynamically light particles thus are capable of a longer term release of an encapsulated agent in the lungs. Following inhalation, aerodynamically light biodegradable particles can deposit in the lungs (due to their relatively low tap density), and subsequently undergo slow degradation and drug release, without the majority of the particles being phagocytosed by alveolar macrophages. The drug can be delivered relatively slowly into the alveolar fluid, and at a controlled rate into the blood stream, minimizing possible toxic responses of exposed cells to an excessively high concentration of the drug. The aerodynamically light particles thus are highly suitable for inhalation therapies, particularly in controlled release applications.

The preferred mean diameter for aerodynamically light particles for inhalation therapy is at least about 5  $\mu\text{m}$ , for example between about 5 and 30  $\mu\text{m}$ . The particles may be fabricated with the appropriate material, surface roughness, diameter and tap density for localized delivery to selected regions of the respiratory tract such as the deep lung or upper airways. For example, higher density or larger particles may be



used for upper airway delivery, or a mixture of different sized particles in a sample, provided with the same or different therapeutic agent may be administered to target different regions of the lung in one administration.

*Density and Deposition of Aerodynamically Light Particles*

5        As used herein, the phrase "aerodynamically light particles" refers to particles having a tap density less than about 0.4 g/cm<sup>3</sup>. The tap density of particles of a dry powder may be obtained using a GeoPyc™ (Micrometrics Instrument Corp., Norcross, GA 30093). Tap density is a standard measure of the envelope mass density. The envelope mass  
10       density of an isotropic particle is defined as the mass of the particle divided by the minimum sphere envelope volume within which it can be enclosed. Features which can contribute to low tap density include irregular surface texture and porous structure.

         Inertial impaction and gravitational settling of aerosols are  
15       predominant deposition mechanisms in the airways and acini of the lungs during normal breathing conditions. Edwards, D.A., *J. Aerosol Sci.*, 26: 293-317 (1995). The importance of both deposition mechanisms increases in proportion to the *mass* of aerosols and not to particle (or envelope) volume. Since the site of aerosol deposition in the lungs is determined by  
20       the mass of the aerosol (at least for particles of mean aerodynamic diameter greater than approximately 1 μm), diminishing the tap density by increasing particle surface irregularities and particle porosity permits the delivery of larger particle envelope volumes into the lungs, all other physical parameters being equal.

25       The low tap density particles have a small aerodynamic diameter in comparison to the actual envelope sphere diameter. The aerodynamic diameter,  $d_{\text{aer}}$ , is related to the envelope sphere diameter,  $d$  (Gonda, I., "Physico-chemical principles in aerosol delivery," in *Topics in Pharmaceutical Sciences 1991* (eds. D.J.A. Crommelin and K.K. Midha), pp. 95-117, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1992)),  
30       by the formula:

$$d_{\text{acr}} = d\sqrt{\rho}$$

where the envelope mass  $\rho$  is in units of  $\text{g/cm}^3$ . Maximal deposition of monodisperse aerosol particles in the alveolar region of the human lung ( $\sim 60\%$ ) occurs for an aerodynamic diameter of approximately  $d_{\text{acr}} = 3 \mu\text{m}$ .

- 5 Heyder, J. *et al.*, *J. Aerosol Sci.*, 17: 811-825 (1986). Due to their small envelope mass density, the actual diameter  $d$  of aerodynamically light particles comprising a monodisperse inhaled powder that will exhibit maximum deep-lung deposition is:

10 
$$d = 3/\sqrt{\rho} \mu\text{m} \text{ (where } \rho < 1 \text{ g/cm}^3\text{);}$$

- where  $d$  is always greater than  $3 \mu\text{m}$ . For example, aerodynamically light particles that display an envelope mass density,  $\rho = 0.1 \text{ g/cm}^3$ , will exhibit a maximum deposition for particles having envelope diameters as large as  $9.5 \mu\text{m}$ . The increased particle size diminishes interparticle  
15 adhesion forces. Visser, J., *Powder Technology*, 58:1-10. Thus, large particle size increases efficiency of aerosolization to the deep lung for particles of low envelope mass density, in addition to contributing to lower phagocytic losses.

#### Targeting of Particles

- 20 Targeting molecules can be attached to the particles via reactive functional groups on the particles. For example, targeting molecules can be attached to the amino acid groups of functionalized polyester graft copolymer particles, such as poly(lactic acid-co-lysine) (PLAL-Lys) particles. Targeting molecules permit binding interaction of the particle  
25 with specific receptor sites, such as those within the lungs. The particles can be targeted by attachment of ligands which specifically or non-specifically bind to particular targets. Exemplary targeting molecules include antibodies and fragments thereof including the variable regions, lectins, and hormones or other organic molecules capable of specific  
30 binding, for example, to receptors on the surfaces of the target cells.

### Therapeutic Agents

- Any of a variety of therapeutic or prophylactic agents can be incorporated within the particles, or used to prepare particles consisting solely of the agent and surfactant. The particles can be used to locally or systemically deliver a variety of incorporated agents to an animal. Examples include synthetic inorganic and organic compounds, proteins and peptides, polysaccharides and other sugars, lipids, and DNA and RNA nucleic acid sequences having therapeutic, prophylactic or diagnostic activities. Nucleic acid sequences include genes, antisense molecules which bind to complementary DNA to inhibit transcription, and ribozymes. The agents to be incorporated can have a variety of biological activities, such as vasoactive agents, neuroactive agents, hormones, anticoagulants, immunomodulating agents, cytotoxic agents, prophylactic agents, antibiotics, antivirals, antisense, antigens, and antibodies. In some instances, the proteins may be antibodies or antigens which otherwise would have to be administered by injection to elicit an appropriate response. Compounds with a wide range of molecular weight can be encapsulated, for example, between 100 and 500,000 grams or more per mole.
- Proteins are defined as consisting of 100 amino acid residues or more; peptides are less than 100 amino acid residues. Unless otherwise stated, the term protein refers to both proteins and peptides. Examples include insulin and other hormones. Polysaccharides, such as heparin, can also be administered.
- The polymeric aerosols are useful as carriers for a variety of inhalation therapies. They can be used to encapsulate small and large drugs, release encapsulated drugs over time periods ranging from hours to months, and withstand extreme conditions during aerosolization or following deposition in the lungs that might otherwise harm the encapsulated therapeutic.

The particles may include a therapeutic agent for local delivery within the lung, such as agents for the treatment of asthma, emphysema,

or cystic fibrosis, or for systemic treatment. For example, genes for the treatment of diseases such as cystic fibrosis can be administered, as can beta agonists for asthma. Other specific therapeutic agents include, but are not limited to, insulin, calcitonin, leuprolide (or gonadotropin-releasing hormone ("LHRH")), granulocyte colony-stimulating factor ("G-CSF"), parathyroid hormone-related peptide, somatostatin, testosterone, progesterone, estradiol, nicotine, fentanyl, norethisterone, clonidine, scopolomine, salicylate, cromolyn sodium, salmeterol, formeterol, albuterol, and valium.

Those therapeutic agents which are charged, such as most of the proteins, including insulin, can be administered as a complex between the charged therapeutic agent and a molecule of opposite charge. Preferably, the molecule of opposite charge is a charged lipid or an oppositely charged protein.

#### **Diagnostic agents**

Any of a variety of diagnostic agents can be incorporated within the particles, which can locally or systemically deliver the incorporated agents following administration to a patient. Any biocompatible or pharmacologically acceptable gas can be incorporated into the particles or trapped in the pores of the particles using technology known to those skilled in the art. The term gas refers to any compound which is a gas or capable of forming a gas at the temperature at which imaging is being performed. In one embodiment, retention of gas in the particles is improved by forming a gas-impermeable barrier around the particles.

Such barriers are well known to those of skill in the art.

Other imaging agents which may be utilized include commercially available agents used in positron emission tomography (PET), computer assisted tomography (CAT), single photon emission computerized tomography, x-ray, fluoroscopy, and magnetic resonance imaging (MRI).

Examples of suitable materials for use as contrast agents in MRI include the gadolinium chelates currently available, such as diethylene

triamine pentacetic acid (DTPA) and gadopentotate dimeglumine, as well as iron, magnesium, manganese, copper and chromium.

Examples of materials useful for CAT and x-rays include iodine based materials for intravenous administration, such as ionic monomers typified by diatrizoate and iothalamate, non-ionic monomers such as  
5 iopamidol, isohexol, and ioversol, non-ionic dimers, such as iotrol and iodixanol, and ionic dimers, for example, ioxagalte.

Porous particles can be prepared which can be delivered via pulmonary delivery, and used, for example, for local or systemic delivery  
10 of incorporated agents and/or for imaging purposes. Particles incorporating diagnostic agents can be detected using standard techniques available in the art and commercially available equipment.

#### Administration

The particles may be administered alone or in any appropriate  
15 pharmaceutically acceptable carrier, such as a liquid, for example saline, or a powder, for administration to the respiratory system. They can be co-delivered with larger carrier particles, not including a therapeutic agent, the latter possessing mass mean diameters for example in the range between 50  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$ .

Aerosol dosage, formulations and delivery systems may be selected  
20 for a particular therapeutic application, as described, for example, in Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:273-313, 1990; and in Moren, "Aerosol dosage forms and  
25 formulations," in: *Aerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy*, Moren, et al., Eds, Esvier, Amsterdam, 1985.

The greater efficiency of aerosolization by the particles disclosed herein relative to particles that do not include a surfactant or a charged complex of a therapeutic agent permits more of a therapeutic agent to be  
30 delivered. The use of biodegradable polymers permits controlled release in the lungs and long-time local action or systemic bioavailability.

Denaturation of macromolecular drugs can be minimized during aerosolization since macromolecules can be contained and protected within a polymeric shell. Coencapsulation of peptides with peptidase-inhibitors can minimize peptide enzymatic degradation. Pulmonary delivery  
5 advantageously can eliminate the need for injection. For example, the requirement for daily insulin injections can be avoided.

The present invention will be further understood by reference to the following non-limiting examples.

**Example 1: Synthesis of Aerodynamically Light Poly[(p-carboxyphenoxy)-hexane anhydride] ("PCPH")**  
10 **Particles**

Aerodynamically light poly[(p-carboxyphenoxy)-hexane anhydride] ("PCPH") particles were synthesized as follows. 100 mg PCPH (MW ~25,000) was dissolved in 3.0 mL methylene chloride. To this clear  
15 solution was added 5.0 mL 1% w/v aqueous polyvinyl alcohol (PVA, MW ~25,000, 88 mole % hydrolyzed) saturated with methylene chloride, and the mixture was vortexed (Vortex Genie 2, Fisher Scientific) at maximum speed for one minute. The resulting milky-white emulsion was poured into a beaker containing 95 mL 1% PVA and homogenized  
20 (Silverson Homogenizers) at 6000 RPM for one minute using a 0.75 inch tip. After homogenization, the mixture was stirred with a magnetic stirring bar and the methylene chloride quickly extracted from the polymer particles by adding 2 mL isopropyl alcohol. The mixture was continued to stir for 35 minutes to allow complete hardening of the  
25 microparticles. The hardened particles were collected by centrifugation and washed several times with double distilled water. The particles were freeze dried to obtain a free-flowing powder void of clumps. Yield, 85-90%.

The mean diameter of a typical batch prepared by this protocol is  
30 6.0  $\mu\text{m}$ , however, particles with mean diameters ranging from a few hundred nanometers to several millimeters may be made with only slight modifications. Scanning electron micrograph photos of a typical batch of

PCPH particles showed the particles to be highly porous with irregular surface shape. The particles have a tap density less than 0.4 g/cm<sup>3</sup>.

A surfactant such as DPPC may be incorporated into the polymer solution prior to particle formation, or optionally the particles can be  
5 ionically or covalently coated by surfactant on the particle surface after particle formation, or the surfactant may be absorbed onto the particle surface.

**Example 2: Synthesis of Spray-Dried Particles.**

*Aerodynamically Light Particles Containing Polymer and Drug  
10 Soluble in Common Solvent*

Aerodynamically light 50:50 PLGA particles were prepared by spray drying with testosterone encapsulated within the particles according to the following procedures. 2.0 g poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) with a molar ratio of 50:50 (PLGA 50:50, Resomer RG503, B.I. Chemicals,  
15 Montvale, NJ) and 0.50 g testosterone (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) are completely dissolved in 100 mL dichloromethane at room temperature. The mixture is subsequently spray-dried through a 0.5 mm nozzle at a flow rate of 5 mL/min using a Buchi laboratory spray-drier (model 190, Buchi, Germany). The flow rate of compressed air is 700  
20 nl. The inlet temperature is set to 30°C and the outlet temperature to 25°C. The aspirator is set to achieve a vacuum of -20 to -25 bar. The yield is 51% and the mean particle size is approximately 5 µm. Larger particle size can be achieved by lowering the inlet compressed air flow rate, as well as by changing other variables. The particles are  
25 aerodynamically light, as determined by a tap density less than or equal to 0.4 g/cm<sup>3</sup> and an aerodynamic diameter between one and five microns. Porosity and surface roughness can be increased by varying the inlet and outlet temperatures, among other factors.

*Aerodynamically Light Particles Containing Polymer and Drug in  
30 Different Solvents*

Aerodynamically light PLA particles with a model hydrophilic drug (dextran) were prepared by spray drying using the following

procedure. 2.0 mL of an aqueous 10% w/v FITC-dextran (MW 70,000, Sigma Chemical Co.) solution was emulsified into 100 mL of a 2% w/v solution of poly (D,L-lactic-acid) (PLA, Resomer R206, B.I. Chemicals) in dichloromethane by probe sonication (Sonics & Materials, Model VC-250 sonicator, Danbury, CT). The emulsion is subsequently spray-dried at a flow rate of 5 mL/min with an air flow rate of 700 nl/h (inlet temperature = 30°C, outlet temperature = 21°C, -20 mbar vacuum). The yield is 56%.

*Aerodynamically Light Protein Particles*

Aerodynamically light lysozyme particles were prepared by spray drying using the following procedure. 4.75 g lysozyme (Sigma) was dissolved in 95 mL double distilled water (5% w/v solution) and spray-dried using a 0.5 mm nozzle and a Buchi laboratory spray-drier. The flow rate of compressed air was 725 nl/h. The flow rate of the lysozyme solution was set such that, at a set inlet temperature of between 97 and 100°C, the outlet temperature is between 55 and 57°C. The aspirator was set to achieve a vacuum of -30 mbar. The enzymatic activity of lysozyme was found to be unaffected by this process and the yield of the aerodynamically light particles was 66%.

*Aerodynamically Light High-Molecular Weight Water-Soluble Particles*

Aerodynamically light dextran particles were prepared by spray drying using the following procedure. 6.04 g DEAE dextran (Sigma) was dissolved in 242 mL double distilled water (2.5% w/v solution) and spray-dried using a 0.5 mm nozzle and a Buchi laboratory spray-drier. The flow rate of compressed air was 750 nl/h. The flow rate of the DEAE-dextran solution was set such that, at a set inlet temperature of 155°C, the outlet temperature was 80°C. The aspirator was set to achieve a vacuum of -20 mbar. The yield of the aerodynamically light particles was 66%.

*Aerodynamically Light Low-Molecular Weight Water-Soluble Particles*



Aerodynamically light trehalose particles were prepared by spray drying using the following procedure. 4.9 g trehalose (Sigma) was dissolved in 192 mL double distilled water (2.5% w/v solution) and spray-dried using a 0.5 mm nozzle and a Buchi laboratory spray-drier.

5 The flow rate of compressed air 650 nl/h. The flow rate of the trehalose solution was set such that, at a set inlet temperature of 100°C, the outlet temperature was 60°C. The aspirator was set to achieve a vacuum of -30 mbar. The yield of the aerodynamically light particles was 36%.

10 *Aerodynamically Light Low-Molecular Weight Water-Soluble Particles*

Polyethylene glycol (PEG) is a water-soluble macromolecule, however, it cannot be spray dried from an aqueous solution since it melts at room temperatures below that needed to evaporate water. As a result, PEG was spray-dried at low temperatures from a solution in

15 dichloromethane, a low-boiling organic solvent. Aerodynamically light PEG particles were prepared by spray drying using the following procedure. 5.0 g PEG (MW between 15,000 and 20,000, Sigma) was dissolved in 100 mL double distilled water (5.0% w/v solution) and spray-dried using a 0.5 mm nozzle and a Buchi laboratory spray-drier.

20 The flow rate of compressed air 750 nl/h. The flow rate of the PEG solution was set such that, at a set inlet temperature of 45°C, the outlet temperature was between 34 and 35°C. The aspirator was set to achieve a vacuum of -22 mbar. The yield of the aerodynamically light particles (tap density less than 0.4 g/cm<sup>3</sup>) was 67%.

25 A surfactant such as DPPC may be incorporated into the polymer solution prior to particle formation, or optionally the particles can be ionically or covalently coated by surfactant on the particle surface after particle formation, or the surfactant may be absorbed onto the particle surface.

## Materials and Methods

The following materials and methods were used in Examples 3 and 4.

### Materials

5       The polymers: poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) with a molar ratio of 50:50 and reported molecular weights of 100,000 Daltons (PLGA RG506) and 34,000 Daltons (PLGA RG503), and poly(D,L-lactic acid) with a reported molecular weight of 100,000 Daltons (PLA R206) were obtained from Boehringer Ingelheim (distributed by B.I. Chemicals, 10 Montvale, NJ). Fluorescently labelled FITC-Dextran with an average molecular weight of 19,000, and L, $\alpha$ -phosphatidylcholine dipalmitoyl (DPPC) were purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

### Microsphere Preparation: Double Emulsion

A double-emulsion solvent-evaporation procedure (Cohen, S., *et al.*, *Pharm. Res.*, 8(6): 713-720 (1991); and Tabata, Y., *et al.*, *Pharm. Res.*, 10(4): 487-496 (1993)), was modified to prepare microspheres for aerosolization. Briefly, 300  $\mu$ l of an aqueous FITC-Dextran solution (50 mg/ml) was emulsified on ice into a 4.0 ml polymer solution in methylene chloride (200 mg polymer) by sonication at output 3 (Model VC-250, 20 Sonics & Materials Inc., Danbury, CT) using a microtip for 5-10 s to form the inner-emulsion. The first emulsion was poured into 100 ml 1.0 % aqueous PVA solution and homogenized (Model LD4 Homogenizer, Silverson Machines Ltd, England) at 6000 RPM using a 5/8" tip for 1 min to form the double emulsion. The microspheres were continuously 25 stirred for 3 hours to allow hardening, collected by centrifugation, washed several times with double-distilled water, and freeze-dried into a freely flowing powder. Microspheres containing DPPC were prepared by dissolving DPPC in the polymer solution at a concentration of 3 mg/ml prior to the initial emulsification.

### Microsphere Preparation: Spray Drying

30       The model hydrophilic drug, dextran labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC-Dextran), was encapsulated into PLA or PLGA by a

novel emulsion/spray method. For example, 2.0 ml of an aqueous 10% w/v FITC-Dextran (MW=70,000, Sigma Chemical Co.) solution was emulsified into 100 ml of a 2 % w/v solution of PLA in dichloromethane by probe sonication. The emulsion was subsequently spray-dried using a Büchi Mini Spray Drier (Model 190, Büchi Instruments, Germany) at a flow rate of 5 ml/min with an inlet air flow rate of 700 nl/h, inlet temperature of 30°C, outlet temperature of 21°C, and vacuum of - 20 mbar. When DPPC was incorporated it was dissolved in the polymer solution at a concentration of 2 mg/ml prior to emulsification and spray drying.

#### Microsphere Size Distribution Analysis

Microsphere size distributions were determined using a Coulter Multisizer II (Coulter Electronics Limited, Luton, Beds, England). Approximately 10 drops Coulter type IA non-ionic dispersant were added, followed by 2 mL isoton II solution (Coulter), to 5-10 mg microspheres, and the spheres were dispersed by brief vortex mixing. This suspension was added to 50 mL isoton II solution until the coincidence of particles was between 5 and 8 %. Greater than 500,000 particles were counted for each batch of spheres.

#### Drug Distribution by Confocal Microscopy

For confocal microscopy, a few milligrams of microspheres containing FITC-Dextran as the drug were suspended in glycerin by brief probe sonication (Vibra-cell Model VC-250 Sonicator, 1/8" microtip probe, Sonics & Materials Inc., Danbury, CT) at output 4 (50W). A drop of the suspension was placed onto a glass slide and a glass cover slip was applied and held in place with finger nail polish. The suspension was allowed to settle for one hour before being viewed by confocal microscopy (Bio-Rad MRC-600 Confocal, Axioplan microscope).

#### Microsphere Morphology by Scanning Electron Microscopy (SEM)

Microsphere morphology was observed by scanning electron microscopy (SEM) using a Stereoscan 250 MK3 microscope from Cambridge Instruments (Cambridge, MA) at 15 kV. Microspheres were

freeze-dried, mounted on metal stubs with double-sided tape, and coated with gold prior to observation.

#### Microsphere Density Analysis

Microsphere bulk density was estimated by tap density measurements and confirmed by mercury intrusion analysis at Porous Materials, Inc. (Ithaca, NY).

#### Determination of Amount FITC-Dextran and DPPC Encapsulated

The amount of model drug, FITC-Dextran, encapsulated into microspheres was determined by dissolving 10.0 mg microspheres in 3.0 ml 0.8 N NaOH overnight at 37°C, filtering with a 0.45  $\mu$ m filter (Millipore), and measuring the fluorescence relative to a standard curve (494 nm excitation and 525 nm emission) using a fluorimeter. The drug loading was determined by dividing the amount of FITC-Dextran encapsulated by the theoretical amount if it all were encapsulated. The amount of surfactant, DPPC, encapsulated into microspheres was determined by dissolving 10.0 mg of microspheres in chloroform and using the Stewart Assay (New, R.R.C., "Characterization of Liposomes," in *Liposomes: A Practical Approach*, R. New, Editor, IRL Press, New York, 105-161 (1990)).

#### In Vitro Aerosolization and Inertial Deposition Behavior

The *in vitro* microparticle aerodynamic characteristics were studied using an Andersen Mark I Cascade Impactor (Andersen Samplers, Atlanta, GA) at an air flow rate of 28.3 l/min. The metal impaction plates were coated with a thin film of Tween 80 minimize particle bouncing Turner, J. and S. Hering, *J. Aerosol Sci.*, **18**: 215-224 (1987). Gelatin capsules (Eli Lilly) were charged with 20 mg of microparticles and loaded into a Spinhaler® inhalation device (Fisons, Bedford, MA). The aerosolization experiments were done in triplicate. In each experiment, 10 inhalers were discharged for 30 seconds into the impactor. A 60-second interval was observed between every two consecutive aerosolizations. Fractions of microspheres deposited on each of nine stages, corresponding to stages 0 to 7, and the filter (F) of the impactor,

were collected in volumetric flasks by carefully washing the plates with NaOH solution (0.8 N) in order to provide degradation of the polymer and complete dissolution of the fluorescent material. After 12 hours of incubation at 37°C, the solutions were filtered with a 0.45  $\mu$ m filter and the amount of fluorescent material in each stage was measured at 494 nm (excitation) and 525 nm (emission) using a fluorimeter. Respirable fraction of the delivered dose was calculated according to the fluorescence measurements as percentages of the total fluorescence (i.e., that amount collected in stages 0 to Filter) compared with that collected in stages 2 to Filter of the Impactor.

*In Vivo* Particle Distribution Following Aerosolization in Rats

Male Sprague Dawley rats (between 150 and 200 g) were anesthetized using a mixture of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The anesthetized rat was placed ventral side up on a surgical table provided with a temperature controlled pad to maintain physiological temperature. The animal was cannulated above the carina with an endotracheal tube connected to a Harvard ventilator (Rodent Ventilator Model 683, South Natick, MA). The animal was force ventilated for 20 minutes at 300 ml/min. 50 mg of microspheres made with or without DPPC were introduced into the endotracheal tube. Following the period of forced ventilation, the animal was sacrificed and the lungs and trachea were separately washed using bronchialveolar lavage as follows: a tracheal cannula was inserted, tied into place, and the airways were washed with 10 ml aliquots of phenol red-free Hanks balanced salt solution (Gibco, Grand Island, NY) without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (HBSS). The lavage procedure was repeated until a total volume of 30 ml was collected. The lavage fluid was centrifuged (400 g) and the pellets collected and resuspended in 2 ml HBSS. 100  $\mu$ l was removed for particle counting using a hemacytometer. The remaining solution was mixed with 10 ml of 0.4 N NaOH. After incubation at 37°C for 12 hours, the fluorescence of each solution was measured (wavelengths of 494 nm excitation, 525 nm emission) using a fluorimeter.

**Example 3: Fabrication of PLGA microspheres by a Double Emulsion Process Which Encapsulate a Model High-Molecular-Weight Drug, FITC-Dextran.**

5 Scanning electron microscopy "SEM" photographs showing surface morphology of microspheres (MS) made by the double emulsion process with and without the lung surfactant, DPPC were obtained. By SEM, the microspheres made with and without DPPC by the double emulsion process had very similar surface characteristics and size distribution, as confirmed by size distribution measurements, shown below in Table 1.

10 The efficient entrapment of DPPC within microspheres (83% of theoretical  $\pm$  11% standard deviation, n=6) was confirmed by dissolving an aliquot of MS in chloroform and detecting the DPPC concentration in solution by the Stewart Assay, as shown in Table 1. Particles made by double emulsion with DPPC are easily resuspended in aqueous solution  
15 after lyophilization and are lump-free when dry as determined by light microscopy. Particles made by the double emulsion process without DPPC resuspend easily, however, they appear somewhat agglomerated when dry by light microscopy.

**Table 1. Characteristics of Microparticles used for *In Vitro* and *In Vivo* Aerosolization<sup>a</sup>**

Sample	Mass-Mean (True) Diameter, ( $\mu\text{m}$ )	DPPC Load ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ spheres)	DPPC Loading Efficiency, (%)	FITC-Dextran (Model Drug) Loading Efficiency, (%)
MS without DPPC	$8.5 \pm 0.76$	0	N/A	95.8
MS with DPPC	$8.2 \pm 0.18$	$45 \pm 6$	$83 \pm 11$	82.4

<sup>a</sup> Values are given  $\pm$  standard deviation.

Confocal microscopy was used to evaluate the distribution of the model drug, FITC-Dextran ( $M_w$  19,000), throughout microspheres made without DPPC and with DPPC. In each case, the drug is evenly dispersed throughout the polymer matrix, which can lead to prolonged delivery of macromolecules after placement in an aqueous environment.

The density of the microspheres as determined by mercury intrusion analysis is shown in Table 2 (and confirmed by tap density measurements).

**Table 2. Comparison of Porous Microparticles with Bulk (PLGA 50:50) Polymer**

Sample	Density, $\rho_{MS}$ (g/cc)	Respirable Size Range, $d_{resp}$ ( $\mu\text{m}$ )
Bulk PLGA	1.35	0.69 - 4.05
MS without DPPC	$0.37 \pm 0.03$	1.3 - 7.7
MS with DPPC	$0.30 \pm 0.06$	1.46 - 8.58

Using the concept of aerodynamic diameter (Gonda, I., in *Topics in Pharmaceutical Sciences 1991*, D. Crommelin and K. Midha, Editors, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, pp. 95-117 (1992)), it is possible to determine the size range of the microspheres which are

theoretically respirable given their mass density,  $\rho_{MS}$ . Specifically, it can be shown below in Equation 2 that:

$$\frac{0.8}{\sqrt{\rho_{MS}}} \leq d_{resp} \leq \frac{4.7}{\sqrt{\rho_{MS}}} \quad (2)$$

5

where  $d_{resp}$  corresponds to the diameter of particles (in  $\mu m$ ) theoretically able to enter and remain in the airways without inertial or gravitational deposition (particles smaller than this range are exhaled), and where  $\rho_{MS}$  is in units of g/cc. The theoretical respirable size range of the microspheres also is shown in Table 2. The optimal size range (*i.e.*,  $d_{resp}$ ) for a non-porous PLGA 50:50 microsphere is 0.69-4.05  $\mu m$  (Table 2). The optimal respirable size range for microspheres without DPPC is 1.3-7.7  $\mu m$  and, for microspheres with DPPC, 1.46 - 8.58  $\mu m$  (Table 2). The upper limit on size of respirable particles is increased from 4.05 to greater than 8.5  $\mu m$  when DPPC is used in the PLGA microsphere preparation. Therefore, the use of low density DPPC microspheres allows the use of larger particles for aerosolization, which may have advantages for drug delivery, such as less particle-particle interaction due to decreased surface area to volume ratio, and lower susceptibility to phagocytosis by alveolar macrophages. In addition, a primary effect of DPPC is to render the particles less adhesive and therefore allow improved aerosolization, as demonstrated below.

Figures 1 and 2 show the results of an *in vitro* aerosolization of the PLGA microspheres made by a double emulsion process with and without DPPC. The microspheres were aerosolized as a dry powder released from a Spinhaler® dry powder inhaler (DPI). Figure 1 illustrates the mass-fraction of the initial dose that is released from the dry powder inhaler device (DPI Efficiency) using an Andersen Mark I Cascade Impactor. DPI efficiencies approaching 80% were obtained with microspheres made with and without DPPC. Although the DPI

30



efficiencies for the two batches were nearly the same, a great difference can be seen between microspheres made with and without DPPC when their deposition within the cascade impactor is observed (Figure 2).

Figure 2 shows the mass fraction of aerosolized particles that is deposited in stages 2 through Filter (2-Filter) of the Andersen cascade impactor, considered the stages corresponding to the respirable fraction of the microspheres. Stages 0 and 1 correspond roughly to the mouth and throat, and to the upper airways of the lung, respectively. Stages 2-F correspond to successively deeper fractions of the lung. It can be seen that a much greater percentage of microspheres make it to the latter stages of the impactor (considered deeper portions of the lungs) when DPPC is used in their preparation. Overall, greater than 35% ( $37.0 \pm 2.1$ ) of aerosolized particles made with DPPC are considered respirable compared with  $13.2 \pm 2.9$  % without DPPC, as shown in Table 3. The large difference in respirable fraction between the DPPC and non-DPPC particles is at least in part attributed to reduced particle-particle interaction due to the use of DPPC.

In order to estimate the theoretical respirable fraction (RF) of the microspheres, and compare it with experimentally measured *in vitro* and *in vivo* RF's, size distribution measurements were analyzed to determine the percentage of particles (by mass) of each type (DPPC and non-DPPC) that were within the theoretical respirable size range (*i.e.*,  $d_{resp}$  Table 2). As shown in Table 3, a higher percentage of particles made with DPPC are expected to be respirable compared with non-DPPC particles (63 to 51%, respectively). This theoretical respirable fraction is based on the mass fraction of microspheres with diameters in the respirable size range,  $d_{resp}$  as defined by Eq. (2), and therefore takes into account the different sizes and densities of the two batches of microspheres.

**Table 3. Comparison of Microparticle Aerosolization Properties *In Vitro***

Sample	Theoretical Respirable Fraction (i.e., Mass % of microspheres in Respirable Size Range) <sup>a</sup>	Measured Respirable Fraction (% <i>In Vitro</i> ) <sup>b</sup>
microspheres without DPPC	51 ± 6	13.2 ± 2.9
microspheres with DPPC	63 ± 2	37.0 ± 2.1

<sup>a</sup>Based on theoretical respirable size range ( $d_{\text{resp}}$  Table 2) and size distribution analyses.

<sup>b</sup>Measured using an Andersen Mark I Cascade Impactor.

To determine whether agglomeration forces during particle aerosolization from the Spinhaler device might be playing a role even after the particles enter the impactor system (i.e., primarily non-DPPC particles remain agglomerated in the inspired stream, resulting in deposition in the first two impactor stages: stages 0 and 1), *in vivo* aerosolization experiments were performed in which particles were permitted to fall by gravity into the inspiration stream of a Harvard ventilator system joined with the trachea of an anesthetized rat. In this model, approximately 63% of the inhaled DPPC-PLGA particles deposit in the airways and distal lung regions, whereas 57% of the non-DPPC particles are able to penetrate beyond the trachea in the lungs. These respirable fractions are much nearer to the predicted respirable fractions based upon particle diameter and mass density (Table 3).

Particle aggregation thus is less with DPPC-containing PLGA particles than without DPPC, even though the particles are of similar size and surface morphological features. The use of DPPC thus appears to reduce interparticle attractions, such as van der Waals and electrostatic attractions. It is also possible that the presence of DPPC reduces

moisture absorption which may cause particle-particle interaction by capillary forces.

In addition to the biocompatibility features of DPPC and improvement of surface properties of microspheres for aerosolization, it is possible that the release of DPPC from the slow-eroding PLGA microspheres in the alveolar region of the lungs can more effectively insure the maintenance of normal surfactant fluid composition thereby minimizing the possibility of local toxic side effects. The alveolar surfactant fluid layer is, on average, 10 nm thick (Weibel, E.R., *Morphometry of the Human Lung*, New York: Academic Press (1963)).

**Example 4: Fabrication of PLGA Microspheres by Spray Drying which Encapsulate a Model High Molecular Weight Drug, FITC-Dextran.**

Microspheres were made by spray drying using a variety of polymeric carriers with and without the incorporation of DPPC. The results are summarized in Table 4.

**Table 4. Characterization of Spray Dried Microparticulates**

Sample	Mass-Mean (True) Diameter, ( $\mu$ m)	DPPC Load ( $\mu$ g/mg spheres) and Efficiency (%)	FITC-Dextran Loading Efficiency, (%)	% of Surface Coated with DPPC by ESCA
R206 + DPPC	5.4	<sup>a</sup>	54.9	<sup>a</sup>
R206 - DPPC	4.4	-	64.8	-
RG503 + DPPC	2.0	62.8	65.2	46.5 %
RG503 - DPPC	3.0	-	78.2	-
RG506 + DPPC	4.3	89.1	62.7	42-62 %
RG506 - DPPC	<sup>b</sup>	-	100	-

<sup>a</sup>Not Determined

<sup>b</sup>No reliable determination because the powder was highly aggregated.

Aerosolization properties of the microspheres also were examined, as shown in Table 5. Microspheres made by spray drying with and without DPPC have similar size distributions (Table 5) and mass densities ( $0.49 \pm 0.04$  g/cc). However, the aerosolization performance of spray-dried aerosols made with and without DPPC is markedly different. Figure 3 shows that the fraction of low-molecular-weight PLGA RG503 microparticles that are aerosolized from the dry powder inhaler (i.e., the % of particles that leave the DPI upon simulated inhalation, defined as the DPI Efficiency) is 70.4 % when the particles are made with DPPC compared with only 46.8 % for particles made without DPPC. Furthermore, the deposition of all types of polymer microparticles following aerosolization into an Andersen impactor is greatly improved using DPPC-coated particles (Table 5). Without the use of DPPC,  $\leq 2$  % of the particles aerosolized reach the latter stages of the impactor (those corresponding to the respirable fraction, stages 2-Filter). On the other hand, a maximum of 25.6% of DPPC-coated microspheres reach stages 2-Filter, as shown in Figure 4. Higher respirable fractions may be obtained with particles that contain low molecular weight drugs that are soluble in methylene chloride and therefore do not require the use of water during their preparation.

**Table 5. Summary of Aerosolization Data of microspheres Prepared by Spray Drying with or without DPPC**

Sample	% Aerosolized Particles that reach stages 1 - Filter	% Aerosolized Particles that reach stages 2 - Filter	% Aerosolized Particles that reach stages 3 - Filter	DPI Efficiency
R206 + DPPC	$40.4 \pm 8.4$	$25.6 \pm 2.3$	$18.0 \pm 2.7$	$38.6 \pm 3.7$
R206 - DPPC	$7.4 \pm 2.1$	$1.8 \pm 0.5$	$1.1 \pm 0.3$	$41.0 \pm 4.8$
RG503 + DPPC	$36.0 \pm 9.2$	$14.7 \pm 1.53$	$10.4 \pm 0.46$	$70.4 \pm 2.4$
RG503 - DPPC	$3.3 \pm 0.6$	$2.1 \pm 0.3$	$2.0 \pm 0.3$	$46.8 \pm 8.0$
RG506 + DPPC	$13.7 \pm 9.1$	$7.1 \pm 4.1$	$4.1 \pm 2.5$	$76.6 \pm 8.4$
RG506 - DPPC	$1.8 \pm 0.6$	$1.6 \pm 0.6$	$1.4 \pm 0.7$	$74.0 \pm 7.2$

R206 = PLA, molecular weight approximately 100,000.

RG503 = PLGA 50:50, molecular weight approximately 34,000.

RG506 = PLGA 50:50, molecular weight approximately 100,000.

**Example 5: Fabrication of Estradiol-Containing Lactose:DPPC Particles.**

Materials and Methods: A Niro Atomizer Portable Spray Dryer (Model #68) was used for all of the following Examples. Compressed air with variable pressure ran a rotary atomizer located above the dryer. Liquid feed with varying rate was pumped continuously by an electronic metering pump (LMI, model #A151-192s) to the atomizer. Both inlet and outlet temperatures can be measured and controlled manually. A container was tightly attached to the cyclone to collect the spray dried powder product.

Estradiol-containing particles were prepared to illustrate the preparation of large porous particles that contain a relatively large drug fraction by weight. Estradiol particles of standard mass density (greater than 0.4 g/cc) can be made in various ways. In this example, the particles included 30%  $\beta$ -estradiol, 62% lactose and 8% DPPC by weight. The lactose was dissolved in deionized water and the estradiol and DPPC were dissolved in 95% v/v ethanol. The two solutions were combined to form an 85% v/v ethanol solution. The total concentration of powdered starting materials in the solution was 3.25% w/v. The solution was spray dried under the following condition: The inlet temperature was 160°C; the outlet temperature was 95°C; the atomization pressure was 2 kp/cm<sup>2</sup> (28.45 psi); and the feed rate was 34 ml/min. The resulting spray dried powder had a tap (mass) density of 0.46 g/ml. The mean diameter based on volume, as measured using a Microtrac particle sizer, was 3.5  $\mu$ m, thus giving an aerodynamic diameter of 2.4  $\mu$ m.

In another example, estradiol particles of standard mass density (about 1 g/cc) were prepared by spray drying a solution containing 70% estradiol and 30% DPPC with a total powder concentration of 1.9% w/v in 85% v/v ethanol. The spray dryer was operated under the following conditions; the inlet temperature was 150°C, the outlet temperature was 85°C, the atomization pressure was 1 kp/cm<sup>2</sup> (14.22 psi), and the feed rate was 30 ml/min. The particles produced had a tap density of 0.62

g/ml and a mean diameter of 6  $\mu\text{m}$ , thus giving an approximate aerodynamic diameter of 4.7  $\mu\text{m}$ .

In order to produce light, porous particles, many combinations of operating conditions and powder compositions were tested. Another  
5 example of the preparation of low density particles was as follows; A solution of 90%  $\beta$ -estradiol and 10% DPPC by weight in 95% ethanol was prepared. The solution was then combined with deionized water to make a solution of 85% ethanol. The total powder concentration was 1.1% w/v. The operating conditions were as follows; the inlet  
10 temperature was 110°C, the outlet temperature was 85°C, the atomization pressure was 1  $\text{kp}/\text{cm}^2$  (14.22 psi), and the feed rate was 30 ml/min. The yield was 53.0%. The resulting powder was very flowable, and was made up of particles possessing irregular shapes and rough surfaces, as viewed by a SEM (scanning electron microscope). The mean diameter,  
15 determined by the Microtrac, based on volume was 6  $\mu\text{m}$ . The tap density was 0.28, thus giving an approximate aerodynamic diameter of 2.6 microns, which falls within the desired range of between one and five microns.

**Example 6: Preparation of Lactose:DPPC Carrier Particles.**

20 "Carrier" particles can be created to mimic drug-carrying particles with similar excipient concentrations. Case studies of four carrier particles are discussed below, followed by two examples of adding small concentrations of drug to the carrier particle. In this example, a small weight percentage of drug in the particle is considered to be less than  
25 20% of the total powder weight.

Carrier particles with standard mass density can be prepared via several methods. An example is the following formulation. Solution of lactose in deionized water and DPPC in ethanol were combined to provide a solution containing relative ratios of 67% lactose and 33% DPPC by  
30 weight in 85% ethanol, with the total powder concentration in the solution of about 0.1% w/v. The solution was spray dried under the following conditions; the inlet temperature was 200°C; the outlet temperature was

119°C; the atomization pressure was 3 kp/cm<sup>2</sup> (42.72 psi); and the feed rate was 40 ml/min. The yield of this run was 29.3%. The resulting spray dried powder had a tap (mass) density of 0.41 g/ml and a mean diameter by volume average estimated from an SEM of 2.5 μm, thus giving an approximated aerodynamic diameter of 1.6 microns, which is within the desired range of between one and five microns.

Powder composition, powder concentration, solvent composition and spray drier operating conditions are some of the factors which can be varied in order to produce light, porous carrier particles. Large, porous particles can be made that have a donut-like morphology. Such particles can be prepared, for example, by preparing a solution that includes 33% human albumin, 33% lactose, and 33% DPPC by weight. The human albumin and lactose was dissolved in deionized water and the DPPC was dissolved in 95% ethanol. The two solutions were combined to yield an 85% ethanol solution. The total powder concentration was about 0.1% w/v. The solution was spray dried under the following conditions; the inlet temperature was 110°C; the outlet temperature was 60°C; the atomization pressure was 3 kp/cm<sup>2</sup> (42.72 psi); and the feed rate was 40 ml/min. The yield from this run was 38.5%. The tap (mass) density of the resulting particles was 0.16 g/ml, and the size of this particle on the coulter counter is 7.6 μm, thus giving an approximate aerodynamic diameter of 3.0 μm. (Note: The volume average sizes approximated from the SEM and those determined by the Coulter Counter can be considered equivalent.)

**Example 7: Preparation of Albumin:Lactose:DPPC Particles.**

Another type of large, porous particles looks similar to a dried grape. Particles with this type of morphology can be prepared, for example, by spray drying a solution that contains 20% human albumin, 20% lactose, and 60% DPPC by weight. The human albumin and lactose were dissolved in deionized water and the DPPC was dissolved in 95% ethanol. The two solutions were combined to form an 85% ethanol solution. The total powder concentration was about 0.1% w/v. The

solution was spray dried under the following conditions; the inlet temperature was 110°C; the outlet temperature was 60°C; the atomization pressure was 3 kp/cm<sup>2</sup> (42.72 psi); and the feed rate was 40 ml/min. The yield was 45.0%. The tap (mass) density of this particle is 0.05 g/ml, and the approximate volume-average size of this particle from the SEM was 7 μm, thus giving an approximate aerodynamic diameter of 1.6 μm. Aerosolization studies of this particle yielded the following results; aerosolized fraction was 58.5%; respirable fraction was 26.6%, and respirable fraction of inhaled aerosol was 43.8%.

**Example 8: Preparation of Albumin:Lactose:DPPC Particles.**

Various methods can be used to increase the size of the particles. The particles prepared in this example had roughly the same morphology as those in Example 7, but had a larger particle size. The particles were prepared as follows: A solution of 20% human albumin, 20% lactose, and 60% DPPC by weight was spray dried. The human albumin and lactose were dissolved in deionized water and the DPPC was dissolved in 95% ethanol. The two solutions were combined to form an 85% ethanol solution. The total powder concentration was about 0.2% w/v. The solution was spray dried under the following conditions; the inlet temperature was 110°C; the outlet temperature was 51°C; the atomization pressure was 2 kp/cm<sup>2</sup> (28.48 psi); and the feed rate was 66 ml/min. The yield from this run was 48.6%. The tap (mass) density of the resulting particles was 0.04 g/ml, and the approximate volume-average size of the particles from the SEM was 10 μm, thus giving an approximate aerodynamic diameter of 2.0 microns.

**Example 9: Spray Drying of Insulin:Albumin:Lactose:DPPC Particles.**

This example demonstrates that adding less than 20% drug by weight has little change on the particle morphology, size, tap density, and aerosolization characterizations. For example, human insulin was added at a concentration of about 2% by weight of the particles in Example 7. The particles were prepared by spray drying a solution of 2% human



insulin, 19% human albumin, 19% lactose, and 60% DPPC by weight. The human insulin, human albumin and lactose were dissolved in deionized water and the DPPC was dissolved in 95% ethanol. The solubility of human insulin in the deionized water was increased by  
5 adding a few drops of NaOH (5g NaOH/100 ml deionized water) until the insulin went into solution. The two solutions were combined to form an 85% ethanol solution. The total powder concentration was about 0.1% w/v. The solution was spray dried under the following conditions; the inlet temperature was 110°C; the outlet temperature of 61°C; the  
10 atomization pressure was 3 kp/cm<sup>2</sup> (42.72 psi); and the feed rate was 40 ml/min. The yield from this run was 51.1%. The tap (mass) density of the resulting particles was 0.05 g/ml and the approximate volume-average size of this particle from the SEM was 6.5 μm, thus giving an approximate aerodynamic diameter of 1.5 μm. The morphology of the  
15 particles was very similar to the particles in Example 7. Aerosolization studies of these particles yielded the following results: the aerosolized fraction was 45.0%; the respirable fraction was 15.0%; the respirable fraction of the inhaled aerosol was 58.3%.

**Example 10: Preparation of Albuterol Particles.**

20 Albuterol particles with a relatively small amount of drug by weight were also prepared. In this example, particles were prepared according to the procedure in Example 6, except that 4% albuterol by weight of the particle was added. The particles were formed by spray drying a solution containing 4% albuterol, 33% human albumin, 33%  
25 lactose, and 33% DPPC by weight. The albuterol, human albumin and lactose were dissolved in deionized water and the DPPC was dissolved in 95% ethanol. The solutions were combined to form an 85% ethanol solution. The total powder concentration was about 0.1% w/v. The solution was spray dried under the following conditions; the inlet  
30 temperature was 110°C; the outlet temperature was 60°C; the atomization pressure was 3 kp/cm<sup>2</sup> (42.72 psi); and the feed rate was 40 ml/min. The yield from this run was 46.8%. The tap (mass) density of the resulting

particles was 0.15 g/ml and the size of the particles as measured on a Coulter counter was 7.2  $\mu\text{m}$ , thus giving an approximate aerodynamic diameter of 2.8  $\mu\text{m}$ .

**Example 11: Preparation of Sustained Release Insulin Particles.**

5 Sustained release of insulin out of the particles was achieved by rendering the insulin insoluble. Insulin was dissolved in ultrapure water (0.02% w/v). Protamine was then added (in the proportion insulin/protamine 5/1 w/w) to form an insulin/protamine complex. The formation of the insulin/protamine complex causes the insulin to  
10 precipitate. The complex was dissolved by raising the pH to about 5 with HCl so that the solution could be spray dried. Lactose was then added to the solution. The aqueous solution was then mixed with a 95% v/v ethanol solution containing DPPC. The final concentration of each excipient in the 85% v/v solution was insulin/protamine/lactose/DPPC  
15 2/0.4/37.6/60% w/v. The solution was spray dried under the following conditions; the inlet temperature was 110°C; the outlet temperature was 60°C; the atomization pressure was 3  $\text{kp}/\text{cm}^2$  (42.72 psi); and the feed rate was 40 ml/min. The ability of the particles to provide sustained release *in vitro* was evaluated. Particles suspended in phosphate buffer  
20 saline at pH 7.4 released less than 10% of the incorporated insulin after 5 hours.

**Example 12: Preparation of Insulin:Protamine:Zinc Complexes.**

Particles containing a complex of insulin/protamine/zinc were  
25 prepared according to the process in Example 11. The concentration of each excipient in the ethanol/water (85:15 % v/v) solution was insulin/protamine/zinc chloride/lactose/DPPC 2:0.6:0.25:32.4:60 (% w/v). The solution was spray dried under the same conditions in Example 11. The formulation was also shown to provide sustained  
30 release of insulin *in vitro*.

The particles (8 mg) were inhaled into the lungs of rats using the procedures described in Edwards, et al. (Science, 276, 1868 (1997)). For

comparison purposes, the particles were also injected subcutaneously and non-sustained insulin particles of identical insulin content (without protamine or zinc) were injected subcutaneously and inhaled. Figure 5 shows the plasma concentration per unit time for insulin administered via the various modes of administration. The inhaled protamine/zinc particles resulted in sustained high serum insulin concentrations for at least 24 hours, in contrast to particles without protamine or zinc, which released insulin in less than approximately 5 hours.

Therapeutics other than insulin can be complexed in the same manner and included in the particles. Proteins having an isoelectric point (pI) lower than the physiological pH of 7.4 as insulin (pI=5.3) can be precipitated in the same manner using protamine (e.g., growth hormone, pI=4.9). Proteins having a pI higher than pH of 7.4 (e.g., LHRH, calcitonin) can be precipitated using a negatively charged compound (e.g., dextran-sulfate) or by adding an appropriate salt. This approach can be extended to drugs (e.g., heparin) other than therapeutic proteins as well.

#### **Example 13: Preparation of Sustained Release Albuterol Particles.**

Albuterol particles were prepared to evaluate the sustained release of a hydrophilic molecule from particles. The albuterol-containing particles were prepared as described in Example 7, reducing the percentages of lactose and albumin (while keeping the ratio equal) and adding cholesterol (of varying percentages; 6, 8, 10, 25%) and albuterol (4%). The addition of cholesterol led to an increasingly slower release of albuterol, as shown in Figure 6. Albuterol concentration was measured using a UV spectrophotometer. The data shown in Figure 6 demonstrates that cholesterol can be incorporated into particles to provide sustained albuterol release. Similar results can be achieved by increasing the DPPC concentration beyond 60%.

#### **Example 14: Release Properties of Albumin:DPPC:Lactose:Albuterol Particles.**

Particles (mean diameter 10 $\mu$ m, tap density 0.06 gram<sup>3</sup>) were prepared particles as described in Example 7 with 60% DPPC, 18%

albumin, 18% lactose, and 4% albuterol to demonstrate that sustained release of a hydrophilic molecule such as albuterol can also be achieved without cholesterol. The *in vitro* release of albuterol is shown in Figure 7 both for this formulation and a non-sustained release formulation that  
5 included only lactose (96%) and albuterol (4%). Even without cholesterol, the release of the albuterol was sustained for nearly 24 hours.

Particles (5 mg, i.e. 200  $\mu$ g albuterol dose) were administered to guinea pigs using the procedures in Example 12 to demonstrate that the sustained release albuterol particles could produce sustained  
10 bronchodilation. The animals were administered carbachol prior to measuring airway resistance. Airway resistance was monitored using a Buxco system. Airway resistance dropped sharply following inhalation of the large porous particles (Figures 7 and 8) and remained at statistically low levels for approximately 1 day ( $n = y$ ).

"Placebo" particles (60% DPPC, 20% albumin, 20% lactose) prepared as described in Example 11 were also administered. Airway resistance following carbachol challenge was measured at eight hours following inhalation and 15 hours following inhalation. The airway resistance was  $1.0 \pm 0.3$  and  $1.0 \pm 0.2$  cm H<sub>2</sub>O/ml/sec., proving that the  
15 bronchodilation observed in Figure 8 was due to slow albuterol release.

Slow albuterol release has also been achieved *in vitro* using particles prepared by the methods of Example 7 with 10% DPPC, 86% albumin, and 4% albuterol. However particles prepared with 10% DPPC, 43% albumin, 43% lactose, and 4% albuterol did not display  
25 significantly slower albuterol release *in vitro*, indicating that for relatively low DPPC content, high albumin content is favorable for sustained albuterol release.

These examples demonstrate that by choosing the composition of the spray dried materials and by varying the spray drying parameters, the aerodynamic properties of the inhaled particles can be effectively  
30 controlled. More specifically, the composition of the spray dried material especially affects the density and shape of the particles while the spray

drying parameters have a stronger affect on their size. For instance, increasing the proportion of lactose in the particles make the particles heavier, while increasing the albumin or dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) content makes them lighter. Increasing DPPC content also  
5 increases the particle size. Nevertheless, when a relatively small proportion of drug is incorporated in the particles, the characteristics of the particles remain relatively unaffected. Decreasing the inlet temperature largely increases the size of the particles without greatly affecting their tap density. Increasing the feed rate and decreasing the  
10 pressure of the compressed air both tend to increase the size of the particles without greatly affecting their density. However, these effects are smaller than those of the temperature.

We claim:

1. A particulate composition for drug delivery to the pulmonary system comprising:  
biodegradable particles incorporating a therapeutic agent and a material selected from the group consisting of surfactant and a molecule having a charge opposite to the charge of the therapeutic agent and forming a complex thereto, wherein the particles have a tap density less than  $0.4 \text{ g/cm}^3$  and a mean diameter between  $5 \mu\text{m}$  and  $30 \mu\text{m}$  effective to yield an aerodynamic diameter of the particles of between approximately one and five microns.
2. The composition of claim 1 wherein the aerodynamic diameter of the particles is between approximately one and three microns.
3. The composition of claim 1 wherein at least 50% of the particles have a mean diameter between  $5 \mu\text{m}$  and  $15 \mu\text{m}$  and a tap density less than  $0.1 \text{ g/cm}^3$ .
4. The composition of claim 1 further comprising a pharmaceutically acceptable carrier for administration to the lungs.
5. The composition of claim 1 wherein the particles comprise a biodegradable polymer.
6. The composition of claim 1 wherein the particles comprise a complex of charged molecules and a surfactant.
7. The composition of claim 1 wherein the particles comprise an excipient.
8. The composition of claim 1 wherein the particles have an irregular surface structure.
9. The composition of claim 1 wherein the surfactant is coated on the surface of the particle.
10. The composition of claim 1 wherein the surfactant is incorporated within and on the surface of the particle.
11. The composition of claim 1 wherein the therapeutic agent is selected from the group consisting of proteins, polysaccharides, lipids, nucleic acids and combinations thereof.

12. The composition of claim 1 wherein the therapeutic agent is selected from the group consisting of nucleotides and oligonucleotides.

13. The composition of claim 11 wherein the therapeutic agent is selected from the group consisting of insulin, calcitonin, leuprolide and albuterol.

14. The composition of claim 1 wherein the surfactant is selected from the group consisting of a fatty acid, a phospholipid, and a block copolymer.

15. The composition of claim 14 wherein the surfactant is a phosphoglyceride.

16. The composition of claim 14 wherein the surfactant is L- $\alpha$ -phosphatidylcholine dipalmitoyl.

17. The composition of claim 1 wherein the agent is a charged species and is present as a complex with an oppositely charged species.

18. The composition of claim 17 wherein the agent is hydrophilic and is present as a complex with a hydrophobic moiety.

19. A method for drug delivery to the pulmonary system comprising:

administering to the respiratory tract of a patient in need of treatment an effective amount of biodegradable particles incorporating a therapeutic agent and a molecule selected from the group consisting of surfactant and a molecule having a charge opposite to the charge of the therapeutic agent and forming a complex thereto,

wherein the particles have a tap density less than about 0.4 g/cm<sup>3</sup> and a mean diameter of between 5  $\mu$ m and 30  $\mu$ m effective to yield an aerodynamic diameter of the particles of between approximately one and five microns.

20. The method of claim 19 wherein the aerodynamic diameter of the particles is between approximately one and three microns.

21. The method of claim 19 wherein at least 50% of the administered particles have a mean diameter between 5  $\mu$ m and 15  $\mu$ m.

22. The method of claim 19 wherein at least 50% of the administered particles have a mean diameter between 5  $\mu\text{m}$  and 15  $\mu\text{m}$  and a tap density of less than about 0.1  $\text{g}/\text{cm}^3$ .
23. The method of claim 19 wherein the particles comprise a biodegradable polymer.
24. The method of claim 19 wherein the particles comprise a complex of charged molecules and surfactant.
25. The method of claim 19 wherein the particles comprise an excipient.
26. The method of claim 23 wherein the particles have an irregular surface structure and have surfactant incorporated on or within the particle.
27. The method of claim 19 for delivery to the alveolar zone of the lung wherein at least 90% of the particles have a mean diameter between about 9  $\mu\text{m}$  and 11  $\mu\text{m}$  and a tap density less than 0.1  $\text{g}/\text{cm}^3$ .
28. The method of claim 19 wherein the therapeutic agent is selected from the group consisting of proteins, polysaccharides, lipids, nucleic acids and combinations thereof.
29. The method of claim 19 wherein the therapeutic agent selected from the group consisting of nucleotides and oligonucleotides.
30. The method of claim 28 wherein the therapeutic agent is selected from the group consisting of insulin, calcitonin, leuprolide and albuterol.
31. The method of claim 19 wherein the particles are administered in combination with a pharmaceutically acceptable carrier for administration to the respiratory tract.
32. The method of claim 19 wherein the surfactant is selected from the group consisting of a fatty acid, a phospholipid, and a block copolymer.
33. The method of claim 32 wherein the surfactant is a phosphoglyceride.



34. The method of claim 32 wherein the surfactant is L- $\alpha$ -phosphatidylcholine dipalmitoyl.
35. The method of claim 32 wherein the surfactant is coated on the surface of the particle.
36. The method of claim 32 wherein the surfactant is incorporated within and on the surface of the particle.
37. The method of claim 19 wherein the agent is a charged species and is present as a complex with an oppositely charged species.
38. The method of claim 19 wherein the agent is hydrophilic and is present as a complex with a hydrophobic moiety.

## AMENDED CLAIMS

[received by the International Bureau on 30 June 1998 (30.06.98);  
original claims 1-38 replaced by amended claims 1-31 (4 pages)]

1. A particulate composition for drug delivery to the pulmonary system comprising biocompatible particles incorporating a therapeutic agent and a surfactant, wherein the particles have a tap density less than  $0.4 \text{ g/cm}^3$  and a mean diameter between  $5 \mu\text{m}$  and  $30 \mu\text{m}$  effective to yield an aerodynamic diameter of the particles of between approximately one and five microns.
2. The composition of claim 1 or 17 wherein the aerodynamic diameter of the particles is between approximately one and three microns.
3. The composition of claim 1 or 17 wherein at least 50% of the particles have an aerodynamic diameter between three  $\mu\text{m}$  and  $5 \mu\text{m}$  and a tap density less than  $0.2 \text{ g/cm}^3$ .
4. The composition of claim 1 or 17 further comprising a pharmaceutically acceptable carrier for administration to the lungs.
5. The composition of claim 1 or 17 wherein the particles comprise a biodegradable polymer.
7. The composition of claim 1 or 17 wherein the particles comprise an excipient.
8. The composition of claim 1 or 17 wherein the particles have an irregular surface structure.
9. The composition of claim 1 or 17 wherein the surfactant is coated on the surface of the particle.
10. The composition of claim 1 or 17 wherein the surfactant is incorporated within and on the surface of the particle.
11. The composition of claim 1 or 17 wherein the therapeutic agent is selected from the group consisting of proteins, polysaccharides, lipids, nucleic acids and combinations thereof.

12. The composition of claim 1 or 17 wherein the therapeutic agent is selected from the group consisting of nucleotides and oligonucleotides.

13. The composition of claim 11 wherein the therapeutic agent is selected from the group consisting of insulin, calcitonin, leuprolide, granulocyte colony-stimulating factor, parathyroid hormone-related peptide, somatostatin, testosterone, progesterone, estradiol, nicotine, fentanyl, noresterone, clonidine, scopolamine, salicylate, cromolyn sodium, salmeterol, formeterol, valium and albuterol.

14. The composition of claim 1 or 17 wherein the surfactant is selected from the group consisting of a fatty acid, a phospholipid, and a block copolymer.

15. The composition of claim 14 wherein the surfactant is a phosphoglyceride.

16. The composition of claim 14 wherein the surfactant is L- $\alpha$ -phosphatidylcholine dipalmitoyl.

17. A composition for delivery to the pulmonary system comprising particles formed of a therapeutic agent and a surfactant, wherein the surfactant constitutes greater than 60% of the total weight of the particles.

18. A particulate composition for drug delivery to the pulmonary system comprising:

biocompatible particles incorporating a therapeutic agent which is a charged species and a molecule having a charge opposite to the charge of the therapeutic agent and forming a complex thereto.

19. The composition of claim 18 wherein the particles have a tap density less than 0.4 g/cm<sup>3</sup> and a mean diameter between 5  $\mu$ m and 30  $\mu$ m effective to yield an aerodynamic diameter of the particles of between approximately one and five microns.

20. The composition of claim 18 wherein the agent is hydrophilic, the molecule includes a hydrophobic moiety, and the agent and molecule form a complex.

21. The composition of claim 18 wherein the therapeutic agent is negatively charged and the molecule forms a lipophilic complex.

22. The composition of claim 18 wherein the therapeutic agent is selected from the group consisting of insulin, calcitonin, leuprolide, granulocyte colony-stimulating factor, parathyroid hormone-related peptide, somatostatin, testosterone, progesterone, estradiol, nicotine, fentanyl, norestherone, clonidine, scopolomine, salicylate, cromolyn sodium, salmeterol, formeterol, valium and albuterol.

23. The composition of claim 18 wherein the charged molecule is protamine.

24. The composition of claim 18 wherein the therapeutic agent is insulin, the molecule is protamine, and the complex further comprises zinc.

25. A composition for delivery to the pulmonary system comprising a therapeutic agent selected from the group consisting of testosterone, progesterone, estradiol, and norestherone.

26. The composition of claim 25 wherein the therapeutic agent is estradiol.

27. A composition for sustained release in the lung comprising insulin or albuterol.

28. The composition of claim 27 comprising a complex of insulin, protamine and zinc.

29. The composition of claim 27 providing sustained serum insulin concentrations for at least 24 hours.

30. A method for drug delivery to the pulmonary system comprising:

administering to the respiratory tract of a patient in need of treatment an effective amount of the compositions of any of claims 1-29.

31. A method for manufacture of a medicament for delivery to the pulmonary system comprising preparing the compositions of any of claims 1-29.

1/4

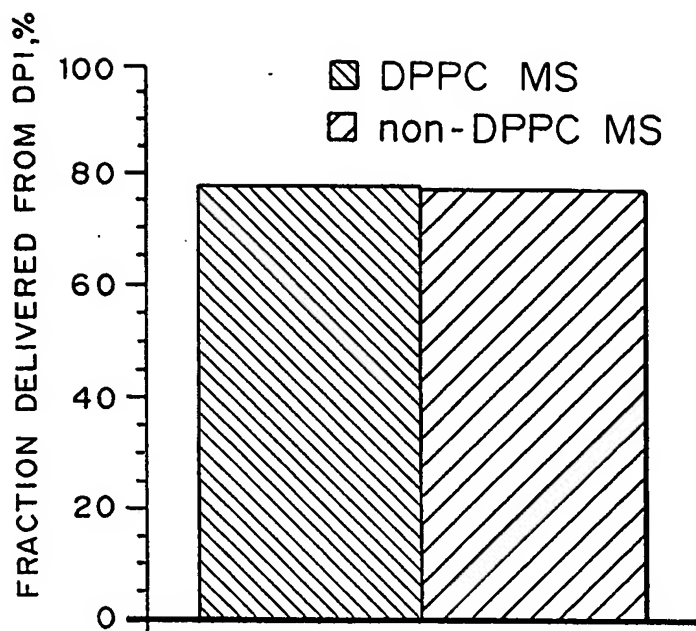


FIG. 1

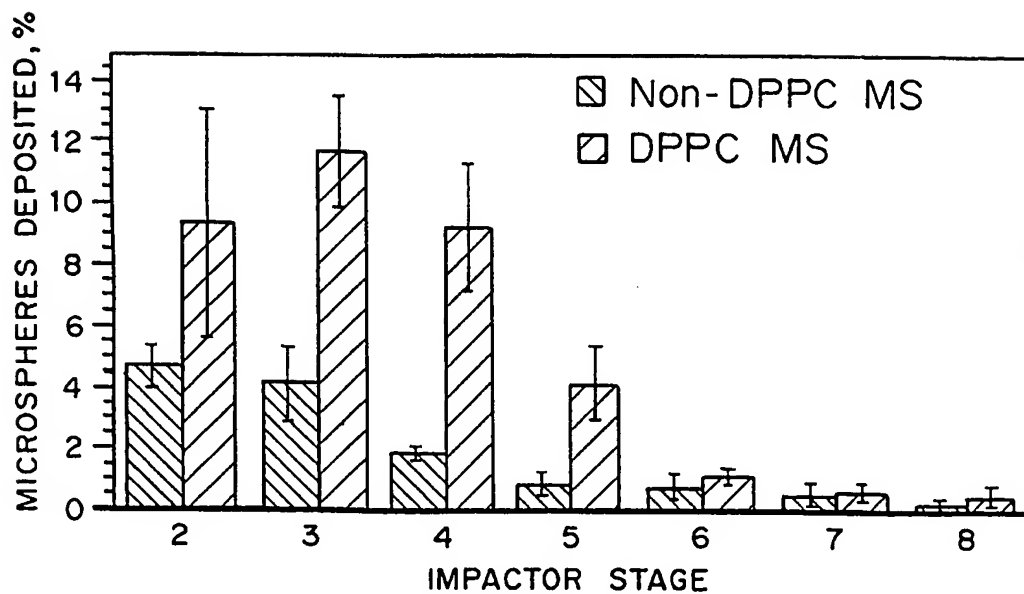


FIG. 2

2/4

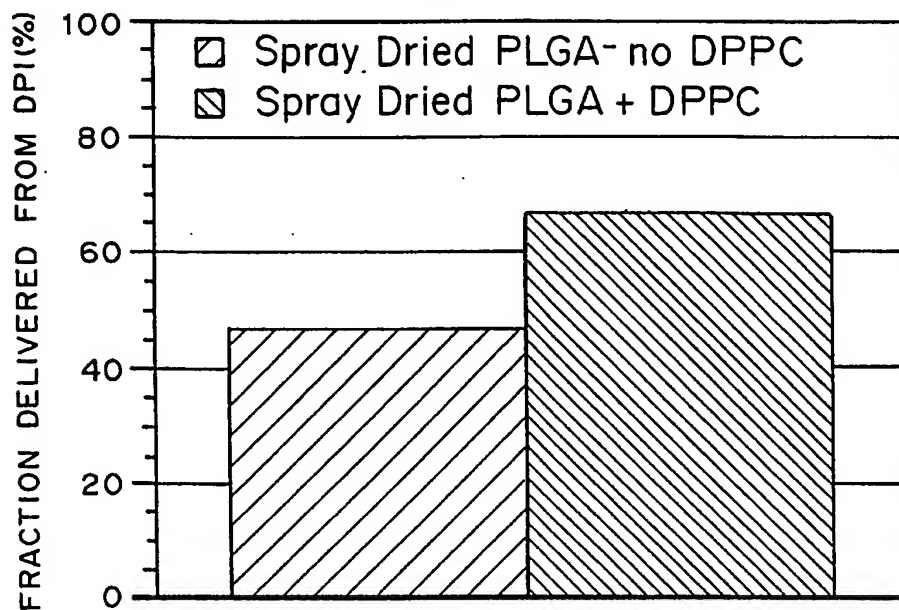


FIG. 3

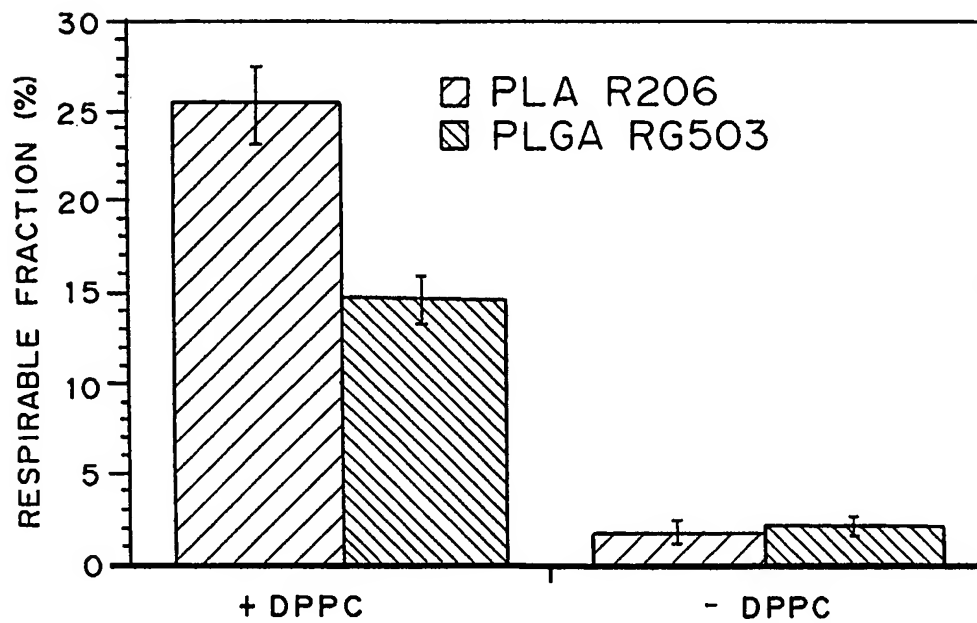


FIG. 4

3/4

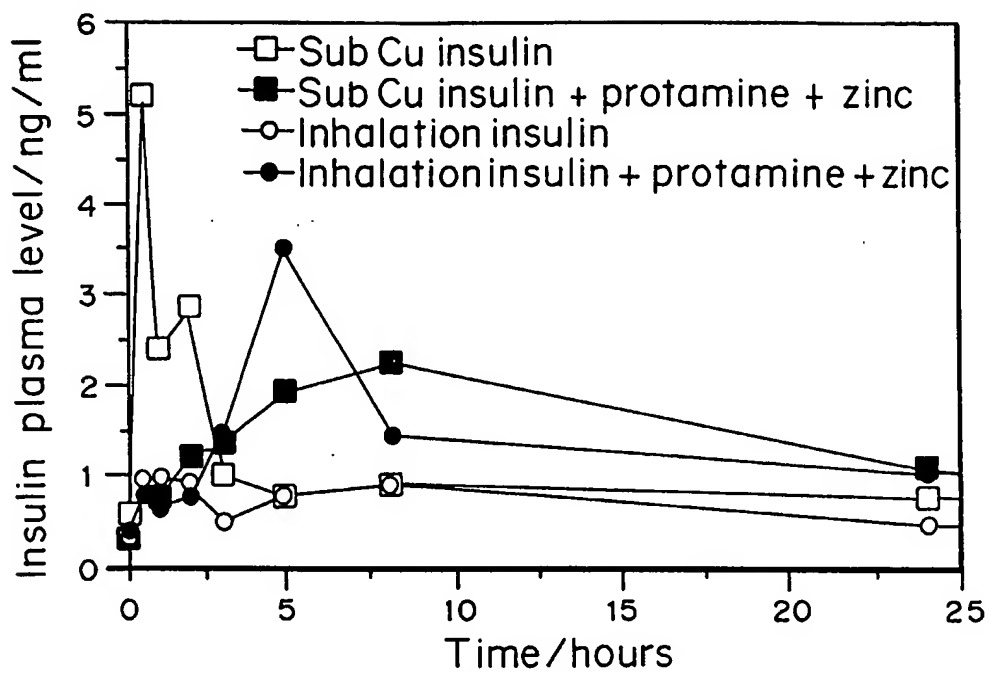


FIG. 5

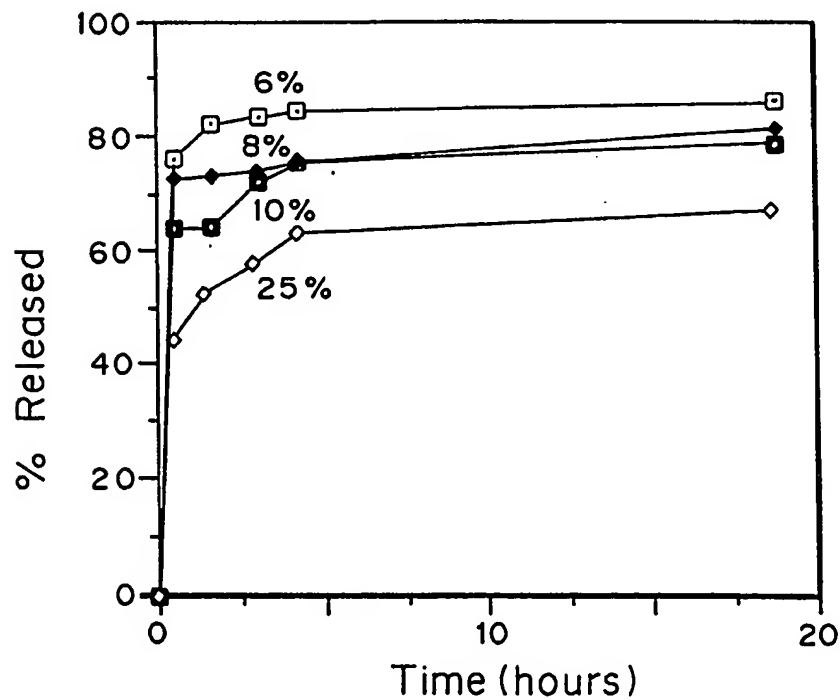


FIG. 6



4/4

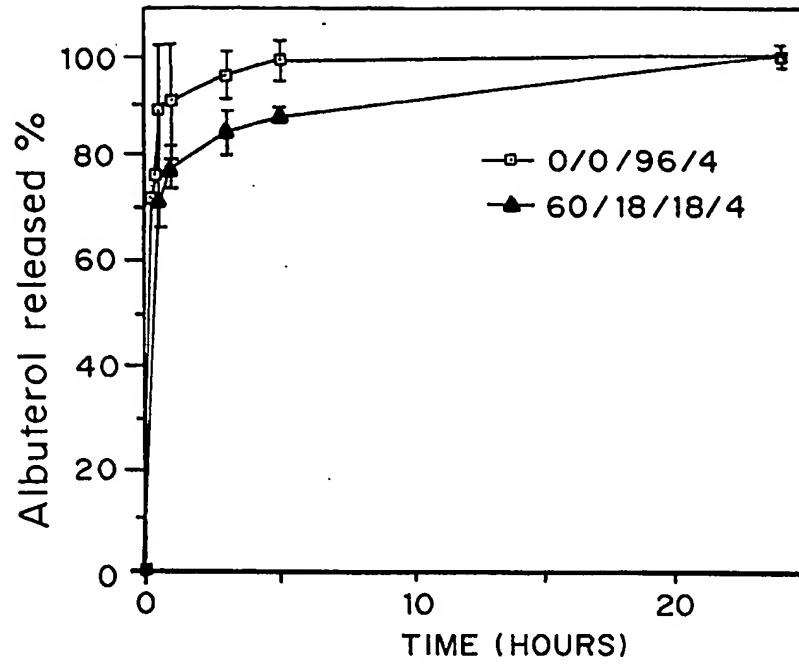


FIG. 7

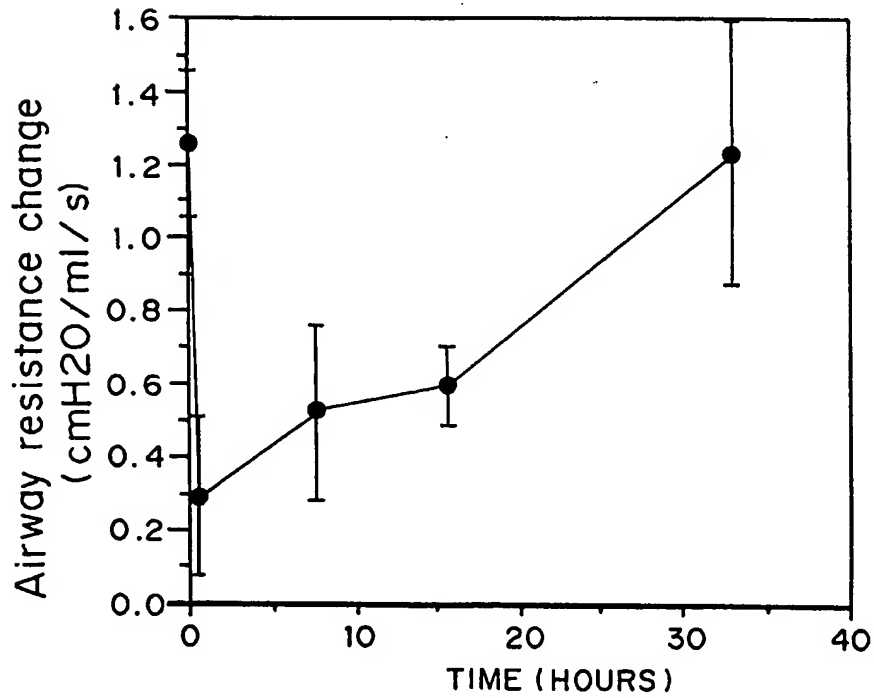


FIG. 8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 97/20930

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K9/12 A61K9/00 A61K9/16 A61K47/48 A61K47/14  
A61K38/28 A61K38/23 A61K38/09 A61K31/135

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. HANES ET AL.: "Porous dry-powder PLGA microspheres coated with lung surfactant for systemic insulin delivery via the lung" PROC. INT. SYMP. CONTROLLED RELEASED BIOACT. MATER., no. 24th, 1997, DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING, MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY, CAMBRIDGE, MA, 02139, USA, pages 57-58, XP002061402 *cf. introduction, and on page 58, right col., "conclusions"* ---	1-38
X	US 5 306 483 A (MAUTONE ALAN J) 26 April 1994 *cf. abstract, col. 1, "background of the invention", col. 2, lines 5-26, col. 8, lines 4-23, ex. 2* ---	1-38
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 April 1998

Date of mailing of the international search report

30.04.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stoltner, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 97/20930

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 510 731 A (ABBOTT LAB) 28 October 1992 *page 2, lines 35-40, lines 45-55, page 3, lines 31-46* ---	1-38
Y	WO 95 35097 A (UNIV NOTTINGHAM ;YEH MING KUNG; COOMBES ALAN GERALD ARTHUR (GB); J) 28 December 1995 *cf. abstract, page 5, lines 15-25, page 5, lines 22-28, page 10, first para.* ---	1-38
Y	EP 0 656 206 A (SCHERING CORP) 7 June 1995 *cf. abstract, page 3, lines 23-55, page 5, lines 41-55* ---	1-38
Y	EP 0 634 166 A (HOECHST AG) 18 January 1995 *cf. col. 2, lines 38-43, col. 3, lines 10-12, col. 4, lines 20-25* ---	1-38
Y	WO 96 09814 A (ANDARIS LTD) 4 April 1996 *cf. abstract, page 5, lines 20-30, page 13, lines 3-9, page 21, ex. 8, claims 1-4, 12 and 17* -----	1-38

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 97/20930

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5306483 A	26-04-94	US 5174988 A EP 0607118 A WO 9101765 A	29-12-92 27-07-94 21-02-91
EP 0510731 A	28-10-92	US 4897256 A US 4851211 A AT 137963 T CA 1300009 A DE 3751811 D DE 3751811 T DE 3785570 A DE 3785570 T EP 0275404 A ES 2089301 T JP 2533586 B JP 63211237 A	30-01-90 25-07-89 15-06-96 05-05-92 20-06-96 28-11-96 27-05-93 18-11-93 27-07-88 01-10-96 11-09-96 02-09-88
WO 9535097 A	28-12-95	AU 2743695 A CA 2193203 A EP 0766554 A FI 965068 A GB 2303551 A JP 9510477 T NO 965403 A	15-01-96 28-12-95 09-04-97 17-02-97 26-02-97 21-10-97 16-12-96
EP 0656206 A	07-06-95	EP 0656207 A AT 134509 T AU 2017592 A CA 2111002 A CN 1067578 A CZ 9302714 A DE 69208660 D DE 69208660 T EP 0518600 A EP 0588897 A ES 2084360 T FI 935464 A HK 185596 A HU 67449 A JP 6511235 T	07-06-95 15-03-96 12-01-93 23-12-92 06-01-93 13-07-94 04-04-96 11-07-96 16-12-92 30-03-94 01-05-96 07-12-93 11-10-96 28-04-95 15-12-94

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 97/20930

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0656206 A		MX 9202750 A NO 934500 A OA 9868 A SK 140493 A WO 9222288 A US 5474759 A	31-12-92 09-12-93 15-08-94 05-10-94 23-12-92 12-12-95
EP 0634166 A	18-01-95	DE 4323636 A CA 2128034 A JP 7053353 A US 5663198 A	19-01-95 16-01-95 28-02-95 02-09-97
WO 9609814 A	04-04-96	AU 3530295 A CA 2199954 A CZ 9700924 A EP 0783298 A FI 971332 A NO 971438 A PL 319600 A	19-04-96 04-04-96 13-08-97 16-07-97 01-04-97 26-03-97 18-08-97